

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSANGELA ESTEL ZIECH

CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. ISOLADA DE INDÚSTRIAS DE AVES
BASEADA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES, TOLERÂNCIA A
SANITIZANTES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

PALOTINA
2015

ROSANGELA ESTEL ZIECH

CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. ISOLADA DE INDÚSTRIAS DE AVES
BASEADA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES, TOLERÂNCIA A
SANITIZANTES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Z65 Ziech, Rosangela Estel
Caracterização de *salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos; Orientador, Luciano dos Santos Bersot - Palotina, PR, 2015.
81p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR – Área de concentração: Saúde Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.

1. Biofilmes. 2. Multirresistência. 3. *Salmonella*. I. Luciano dos Santos Bersot. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título

CDU 636.09

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

ROSANGELA ESTEL ZIECH

"CARACTERIZAÇÃO DE *SALMONELLA* SP. ISOLADA DE INDÚSTRIAS DE AVES BASEADA NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES, TOLERÂNCIA A SANITIZANTES E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS'

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde
Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca
examinadora:

Professor. Dr. Luciâno dos Santos Bersot

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná

Professor. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro: Universidade Estadual Paulista

Professora Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Membro: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Palotina, 10 de fevereiro de 2015

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rosangela Estel Ziech, filha de Romualdo Alido Ziech e Laudete Lottermann Ziech, natural de Giruá-RS 28/10/1989. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Santa Maria em 2013. No mesmo ano ingressou no mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Atuando principalmente na área de Microbiologia dos Alimentos.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Romualdo e Laudete, que nunca mediram forças para oportunizar meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pelo mestrado em Ciência Animal, professores e infra-estrutura.

À Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa por meio do Programa de Pesquisa Básica e Aplicada, convênio 317/2014, Edital 24/2012, Projeto Protocolo nº 38064.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao professor Luciano dos Santos Bersot que aceitou a orientação, me acolheu ao ninho do LACOMA e desafiou a mostrar competência.

A Vanessa e Cibeli pelas coletas, isolamento e identificação das cepas utilizadas no projeto e todo o apoio concedido.

Um agradecimento especial também aos demais colegas de laboratório Mallú, Rosana, Jorge, Nelson, Kamila e todos que de alguma forma me auxiliaram no mestrado e tornaram os meus dias mais agradáveis. Especialmente Ana Paula, Camila, Rúbia e Ricardo que foram meus familiares científicos e passaram comigo momentos fora do “expediente” tornando-se grandes amigos.

À professora Vera Lúcia Mores Rall e demais colegas do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu pela solicitude.

À professora Erica Guirro pela prestatividade, principalmente o empréstimo da leitora de microplacas.

Ao professor Roberto Rochadelli pelo auxílio no projeto paralelo desenvolvido durante o mestrado.

À professora Julia Galvão pela colaboração na microscopia eletrônica de varredura.

À AEB Group pela concessão dos sanitizantes.

Aos amigos de perto e de longe que nunca deixaram de estar presentes nos meus dias e me deram carona, comida, pouso e carinho como se eu fosse parte da família deles.

Às meninas do apartamento Gabi, Rosi, Cris e Mari pela paciência e parceria.

As ex-colegas e amigas Cláudia Balzan e Gabriela Werle que mesmo sem o vínculo do dia-a-dia e morando longe me apoiaram.

A todas as pessoas que de uma forma ou outra me ajudaram nesses dois anos de mestrado.

Agradeço a Deus pela vida, saúde e persistência para buscar meus objetivos.

E por fim, o mais importante: minha família, meus pais Romualdo e Laudete, meu irmão Magnos e minha cunhada Ana Regina. Sem eles nada seria possível, eles abraçaram o mestrado junto comigo e me apoiaram em tempo integral.

Muito obrigada!

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade
e a energia atômica: a vontade”*

Albert Einstein

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* sp. ISOLADA DE INDÚSTRIAS DE AVES BASEADA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES, TOLERÂNCIA A SANITIZANTES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A formação de biofilmes por *Salmonella* sp. é uma preocupação para a indústria de alimentos devido à sua permanência nas superfícies e risco de contaminação constante do produto. Nas salas de corte das indústrias de abate e processamento de aves utilizam-se esteiras condutoras dos produtos, sendo importante caracterizar estirpes de *Salmonella* isoladas a partir deste local. Neste estudo foi avaliada a correlação da formação de biofilmes em microplacas de poliestireno, polipropileno (PP) e poliuretano (PU) e a presença de genes *adrA* e *csgD* relacionados aos componentes formadores da matriz dos biofilmes, celulose e fímbrias, respectivamente. Além disso, foi avaliada a tolerância do biofilme formado no PP e no PU à sanitizantes comumente utilizados na indústria (alcalino clorado, ácido peracético e ambos combinados). Foi avaliada a sensibilidade de *Salmonella* sp. frente a antimicrobianos e a prevalência de estirpes produtoras de ESBL. As 98 estirpes testadas eram originárias de quatro salas de cortes de plantas processadoras de aves. Foi avaliada a formação de biofilmes em placas de poliestireno após incubação de 10^8 UFC/mL de cada estirpe em caldo Luria-Bertani por 96h a 35°C. A formação de biofilmes foi visualizada pela medida da absorbância em leitora de microplacas onde as estirpes foram classificadas em fracamente, moderadamente e fortemente produtoras de biofilmes. Também foi avaliada a formação de biofilmes em *slides* de 1 cm² PP e PU, e um *slide* de cada material com e sem inóculo de *Salmonella* sp. foi observado ao microscópio eletrônico de varredura. Para a avaliação da eficácia dos sanitizantes após incubação por 96h para a formação do biofilme, foram realizados tratamentos por 5, 10, 15 e 30 minutos. As células viáveis foram removidas logo após o tratamento e após reincubação por mais 96h por meio da agitação em *vortex* de tubos com solução salina adicionados de esferas de vidro. Uma alíquota foi semeada em ágar TSA para a contagem de micro-organismos formadores de biofilme que ainda permaneceram viáveis e outra foi transferida para uma placa de 96 poços e acrescida de um marcador de viabilidade celular, para posterior observação em leitora de microplacas. Para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, pelo método de difusão de disco, foram utilizados 18 agentes de 7 classes distintas: ampicilina, cefaclor, ceftiofur, estreptomicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, neomicina, enrofloxacin, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, florfenicol, sulfatrimetoprim, tetraciclina, cloranfenicol, meropenem, imipenem e polimixina B. A produção de ESBL foi avaliada pelo método de disco-difusão dupla. A habilidade de formação de biofilmes em poliestireno foi classificada como fortemente somente em uma estirpe. Nas demais estirpes, em 70% a habilidade de formação de biofilmes foi classificada como fracamente e em 29% como moderadamente formadoras de biofilmes. Apesar da alta frequência de estirpes fracamente positivas, ambos os genes pesquisados foram encontrados em todas as estirpes. Foram observadas diferenças de adesão importantes entre o material comumente utilizado para avaliar a habilidade de formação de biofilmes *in vitro*, o poliestireno, e os materiais utilizados nas superfícies de onde as estirpes foram isoladas, o PP e o PU. Ao microscópio eletrônico de varredura a topografia do PU foi mais rugosa. Em relação ao desafio com sanitizantes, a partir dos *slides* de PP não foi possível recuperar células viáveis. Quando observado o PU, logo após o tratamento, a redução em relação ao controle positivo foi suficiente para considerar os sanitizantes eficazes. Após a reincubação, para o tratamento com ácido peracético essa diferença foi menor. Das 98 estirpes testadas, 86% mostraram-se multirresistentes e 45% das estirpes mostraram-se produtoras de ESBL pelo método utilizado. Os resultados deste estudo são um alerta para a segurança alimentar. Devido à importância do isolamento de estirpes com capacidade de formar biofilmes tanto no material usualmente testado *in vitro* quanto nos materiais que compõem as superfícies em matadouros de aves. Fato que pode incorrer em uma persistência desse micro-organismo na indústria e consequente contaminação dos alimentos. Bem como a emergência de estirpes multirresistentes e produtoras de ESBL isoladas em indústrias de abate e processamento de aves.

Palavras-chave: *Salmonella*, biofilmes, eficácia de sanitizantes, multirresistência

ABSTRACT

BIOFILM FORMATION, TOLERANCE TO SANITIZERS AND RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS IN *Salmonella* sp. ISOLATED FROM POULTRY INDUSTRY

Formation of biofilms by *Salmonella* sp. is a constant concern for the food industry due to their attachment to surfaces and risk of contamination of food products. Cutting rooms in poultry processing and slaughtering plants use conveyor belts in the transport of food products, and it is important that *Salmonella* strains isolated in these sites are characterized. This study analyzed the correlation between biofilm formation in polystyrene microplates, polypropylene (PP) and polyurethane (PU), and the presence of the genes *adrA* and *csgD*, which are related to the formation of biofilm matrices, cellulose and fimbriae, respectively. Tolerance of the biofilm produced in PP and PU against common sanitizers used in the industry (chlorinated alkaline cleaners, peracetic acid, and these two compounds combined) was also evaluated, as well as *Salmonella* sp. sensitivity to antimicrobials and the prevalence of ESBL-producing strains. The 98 strains that were analyzed came from four cutting rooms in poultry processing plants. Biofilm formation in polystyrene plates was evaluated after incubation of 10^8 CFU/mL of each strain in Luria-Bertani broth at 35°C for 96h. Biofilms were assessed by means of absorbance in a microplate reader, and strains were classified as weak, moderate, or strong biofilm-producers. Biofilm formation was also analyzed in 1-cm² PP and PU slides inoculated or not with *Salmonella* sp., and analyzed by scanning electron microscopy. Sanitizer efficiency was evaluated after 96-h incubation for biofilm formation. Sanitizer treatments lasted 5, 10, 15 or 30 minutes. Viable cells were removed from the surfaces soon after the treatment, and after reincubation for 96 h, by vortexing tubes with saline solution added of glass beads. One aliquot was cultured in TSA agar to count biofilm-forming microorganisms that still remained viable, and another aliquot was transferred to a plate with 96 wells that was added of cell viability marker and was later on analyzed in the microplate reader. For the antimicrobial susceptibility test using the disk diffusion method, 18 agents of 9 different antimicrobial classes were used: ampicillin, cephachlor, ceftiofur, streptomycin, tobramycin, gentamycin, amikacin, neomycin, enrofloxacin, nalidixic acid, ciprofloxacin, florphenicol, sulfa/trimethoprim, tetracycline, chloramphenicol, meropenem, imipenem, and polymixin B. ESBL production was assessed by the double disk diffusion method. Only one strain was a strong biofilm-producer in polystyrene. For the other strains, ability to produce microfilms was weak in 70% of them, and moderate in 29% of them. In spite of the high frequency of weakly positive strains, both genes were found in all strains. Important differences in adhesion were observed between the material commonly used in the evaluation of *in vitro* biofilm production – polystyrene – and materials that were used in the surfaces were isolated, PP and PU. Scanning electron microscopy showed that PU had a more irregular surface. No viable cells were recovered in PP slides treated with sanitizers. The reduction in viable cell counts observed in PU soon after sanitizer treatment, compared with the positive control, was enough to consider that sanitizers were efficient. After reincubation, this difference was smaller for the treatment with peracetic acid. From the 98 strains tested, 86% showed to be multiresistant and 45% were ESBL-producers according to the double disk diffusion method. The results of this study are a warning in food safety, due to the importance of the isolation of strains that are able to produce biofilms both on *in vitro* testing materials and in materials that are used as cutting surfaces in poultry processing plants. These microorganisms could remain in the industry and contaminate food products, and multiresistant and ESBL-producing strains may emerge in the poultry processing and slaughtering industry.

Keywords: *Salmonella*, biofilms, sanitizer efficacy, multiresistance

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma da metodologia empregada para avaliar a formação de biofilmes em PU e PP seguido do desafio com sanitizantes e recuperação das células viáveis.35
- Figura 2 - *Slides* de Poliuretano (PU) e Polipropileno (PP) utilizados para testar adesão *in vitro* das estirpes de *Salmonella* sp.36
- Figura 3 - Amplificação da PCR para detecção dos genes *csgD* (123pb) e *adrA* (92 pb).42
- Figura 4 - Imagens obtidas por meV. Na esquerda poliuretano e na direita polipropileno. (A) e (B) sem inóculo, (C) e (D) com adesão de *Salmonella* sp. (1000x). (E), (F), (G) e (H) com adesão de *Salmonella* sp. (10000x).50
- Figura 5 - Distribuição dos perfis de resistência das estirpes de *Salmonella* sp. multirresistentes conforme o resultado de ESBL, produção de biofilmes e sala de corte de origem.56
- Figura 6 - Resultados percentuais do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar realizado em *Salmonella* sp. isoladas de salas de corte em plantas processadoras de aves. Em que: ampicilina (AMP), cefaclor (CFC), ceftiofur (CTF), meropenem (MER), imipenem (IPM), estreptomicina (EST), tobramicina (TOB), gentamicina (GEN), amicacina (AMI), neomicina (NEO), enrofloxacin (ENO), ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), sulfa/trimetoprim (SUT), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLF) e polimixina B (POL).57
- Figura 7 - Estirpe ESBL positiva, observa-se que a zona de inibição em torno do aztreonam (ATM) aumentou na direção do disco central com amoxicilina com ácido clavulânico (AMX/AC) e os halos em torno das cefalosporinas inferiores a 19 mm.59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de <i>Salmonella</i> sp. utilizadas no estudo conforme a sala de corte de origem, tipo de esteira e aspersão de água.	33
Tabela 2 - Sequência 5' – 3' e pb dos <i>primers</i> <i>csgD</i> e <i>adrA</i> utilizados no estudo.	40
Tabela 3 - Médias em log ₁₀ (UFC/cm ²) com 96 e 192 h de incubação e densidade óptica (OD) somente com 96h de incubação a 35°C, conforme a classificação das estirpes de <i>Salmonella</i> sp. segundo a formação de biofilme em poliestireno e nos materiais das esteiras.	44
Tabela 4 - Médias das densidades ópticas (OD) de estirpes de <i>Salmonella</i> sp. conforme a habilidade de formação de biofilme em poliestireno e a interação desse fator com PU e PP em 192 h de incubação a 35°C.....	44
Tabela 5 - Efeito dos tratamentos sobre o logaritmo das médias das contagens em placa do biofilme formado por <i>Salmonella</i> sp. em poliuretano com 96h de incubação a 35°C conforme os tempos testados.....	46
Tabela 6 - Efeito dos tratamentos sobre o logaritmo das médias das contagens em placa do biofilme formado por <i>Salmonella</i> sp. em PU com 96h de incubação, seguido de nova incubação por 96h (total 192h), conforme os tempos testados.	47
Tabela 7 - Efeito dos tratamentos sobre as densidades ópticas médias do biofilme formado por <i>Salmonella</i> em PU e PP com 96h de incubação e seguido de nova incubação por 96h (total 192h) e extraído sob agitação em <i>vortex</i>	51
Tabela 8 - Classificação das estirpes quanto à diferença de OD em relação ao controle negativo conforme o tratamento e o tempo de contato.....	53
Tabela 9 - Médias das leituras de OD dos controles negativos conforme o material, tratamento e tempo de incubação.	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
DO	densidade óptica
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i>
LB	Luria-Bertani
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PP	polipropileno
PU	poliuretano
qsp	quantidade suficiente para
RPM	rotações por minuto
TSA	<i>Trypticase soy agar</i>
U	unidade
UFC	unidade formadora de colônia
XLD	<i>Xylose lysine deoxycholate agar</i>
XTT	<i>2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt</i>
μL	microlitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
pmol	picomol
x g	força centrífuga relativa
X	vez
®	registrado
™	<i>trade mark</i>

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Biofilmes.....	18
3.1.1 Aspectos gerais	18
3.1.2 Importância para indústria de alimentos	19
3.1.3 Biofilmes formados por <i>Salmonella</i> spp.....	21
3.2 Avaliação da formação de biofilmes em superfícies abióticas	23
3.3 Resistência de biofilmes de <i>Salmonella</i> spp. frente a fatores estressantes.....	28
3.3.1 Tolerância a desinfetantes.....	28
3.3.2 Resistência a antimicrobianos e produção ESBL	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Estirpes testadas.....	33
4.2 Formação de biofilmes em placas de poliestireno	33
4.3 Formação de biofilmes em poliuretano e polipropileno	35
4.3.1 Tratamento com sanitizantes.....	37
4.3.2 Quantificação de micro-organismos viáveis	37
4.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	38
4.5 Pesquisa de genes relacionados à formação de biofilmes.....	39
4.6 Microscopia eletrônica de varredura para visualização do biofilme	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Habilidade de formação de biofilmes e tolerância a sanitizantes industriais por <i>Salmonella</i> sp.....	42
5.2 Multirresistência a antimicrobianos e produção de ESBL por <i>Salmonella</i> sp.....	54
6 CONCLUSÕES	59
7 BIBLIOGRAFIA	60
8 APÊNDICES	77
A - Ficha técnica e de segurança do sanitizante alcalino clorado.....	77
B - Ficha técnica e de segurança do sanitizante ácido peracético	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, seguido pelos EUA e União Europeia (UBABEF, 2014). Dentre as unidades federativas, o Paraná aparece como o maior produtor do país. Para alcançar estes patamares foi essencial aumentar a densidade populacional dos frangos de corte. A intensificação da produção colaborou com a produtividade e eficiência da indústria avícola, mas em contrapartida aumentou o risco de disseminação de doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos (LANSINI, 2010).

Existe uma inquietação do segmento avícola em relação à pressão do mercado consumidor a respeito da qualidade dos produtos industrializados, principalmente quanto à presença de micro-organismos de interesse em saúde pública. Para contornar essa situação, as indústrias de produtos cárneos têm desenvolvido medidas de prevenção na criação e dentro das plantas de abate e processamento. Uma ferramenta importante é o sistema Análise de Perigos e Pontes Críticas de Controle (APPCC) que visa à produção de alimentos seguros e é uma abordagem preventiva e sistemática direcionada a perigos biológicos, químicos e físicos, por meio da antecipação e prevenção dos mesmos, em vez de inspeção e testes em produtos finais (FAO, 1998). Apesar das diversas medidas tomadas terem reduzido a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos, não se eliminou totalmente os riscos para o consumidor (LANSINI, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Entre as principais bactérias causadoras destacam-se as do gênero *Salmonella*. Os alimentos de origem animal são os maiores responsáveis pela veiculação desse micro-organismo, principalmente as aves, incluindo-se os frangos de corte, que podem ser portadores assintomáticos de alguns sorotipos patogênicos para os humanos (GREIG & RAVEL, 2009; OLIVEIRA, 2011).

A caracterização fenotípica das estirpes de patógenos alimentares pela avaliação da habilidade de formação de biofilmes é importante uma vez que os biofilmes podem ser potencial fonte de contaminação. Nas indústrias que processam alimentos, as superfícies são constantemente expostas a micro-organismos, tanto deterioradores quanto patogênicos (SCHLISSELBERG & YARON, 2013). Os

biofilmes são difíceis de erradicar e podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo (VESTBY et al., 2009). Na área clínica, o desenvolvimento microbiano e a formação de biofilmes em biomateriais utilizados em implantes e equipamentos hospitalares são fontes importantes de infecções nosocomiais. Além disso, estão relacionados ao aumento da resistência a biocidas, a antibióticos e às defesas imunológicas do próprio hospedeiro (LEJEUNE, 2003).

Em se tratando da segurança alimentar, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada na sua eliminação, o que confere riscos à saúde do consumidor e prejuízos à indústria (FLACH et al., 2005). Na indústria de carnes, especialmente devido à quantidade de matéria orgânica que tende a permanecer nas superfícies, pode haver a formação de biofilmes. Evidenciam-se as salas de corte das indústrias de abate e processamento de aves em que é comum o uso de esteiras transportadoras de produtos, sendo importante obter informações sobre a ocorrência de patógenos como *Salmonella*. A formação de biofilmes por *Salmonella* é um mecanismo que as protege de fatores estressantes, que incluem suscetibilidade reduzida a antimicrobianos e tolerância a desinfetantes. Dessa forma, um estudo detalhado sobre a habilidade de formação de biofilmes, multirresistência a antimicrobianos e produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) por estirpes *Salmonella* isoladas em plantas processadoras de aves é de grande relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar estirpes de *Salmonella* sp. isoladas de plantas de processamento de aves quanto à produção de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos.

2.2 Objetivos específicos

Estimar a biomassa total do biofilme em microplacas de poliestireno.

Pesquisar a presença dos genes *csgD* e *adrA* relacionados à formação de biofilmes.

Comparar a formação de biofilmes em microplacas de poliestireno com a formação em *slides* de poliuretano e polipropileno.

Observar ao microscópio eletrônico de varredura a formação de biofilmes em *slides* de poliuretano e polipropileno.

Realizar um ensaio da viabilidade das células bacterianas do biofilme formado após desafio com os sanitizantes comumente utilizados na indústria (alcalino clorado, ácido peracético e ambos combinados). E avaliar se uma reincubação dos *slides* aumenta a recuperação de células viáveis injuriadas pelo tratamento com os sanitizantes.

Avaliar a prevalência de estirpes multirresistentes a antimicrobianos e produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biofilmes

3.1.1 Aspectos gerais

A maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre com as células individualizadas crescendo na forma planctônica (livre), e sim com as bactérias sésseis, organizadas em biofilmes. Um biofilme consiste em um grupo de células bacterianas organizadas em diferentes graus de complexidade, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e cercadas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS) (O'TOOLE et al., 2000; SAUER, 2003).

Estima-se que os micro-organismos constituam menos de 10% da massa de um biofilme, enquanto que os 90% restantes sejam de material extracelular (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Os demais componentes como água, polissacarídeos e outras macromoléculas também contribuem para a heterogeneidade da matriz dos biofilmes e para a sua função multicelular (PRAKASH et al., 2003). Além destes componentes, os biofilmes possuem microcanais internos, úteis na distribuição de nutrientes e água, no escoamento de metabólitos e enzimas necessários para a sobrevivência das células e para a distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (CASALINI, 2008; BOARI et al., 2009). O *quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação entre células bacterianas, sejam elas da mesma espécie ou de espécies diferentes. É mediado por diferentes sinais químicos semelhantes a hormônios (autoindutores) que são sintetizados e secretados pelas próprias bactérias (BOYEN et al., 2009). Vários patógenos importantes em medicina veterinária, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium* usam o QS para otimizar a expressão de genes de virulência e a colonização do hospedeiro (BOYEN et al., 2009). Alguns autores correlacionam o QS com a capacidade de formação de biofilmes em diferentes espécies bacterianas como *Escherichia coli* O157:H7,

Salmonella (YOON & SOFOS, 2008), *Klebsiella pneumoniae* (BALESTRINO et al., 2005) e *Listeria monocytogenes* (BELVAL et al., 2006).

Na literatura são relatados diferentes mecanismos para explicar a formação de biofilmes. Contudo, há um consenso de que ocorre uma etapa reversível e outra irreversível. A etapa reversível é determinada por variáveis físico-químicas, como interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que vão regular a adesão entre a célula bacteriana e o substrato. Na etapa irreversível, ocorre uma mediação molecular entre adesinas e superfície, em que o micro-organismo consolida sua adesão por meio da produção de EPS e ligação dos receptores específicos presentes nas fímbrias com a superfície do material (KUMAR & ANAND, 1998; BOARI et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; HOUDT, VAN; MICHELIS, 2010). Por outro lado, Monds & O'Toole (2009) são contra a existência de um conceito consolidado e discutem um segundo modelo para a formação de biofilmes. Eles defendem que a formação de biofilmes é muito mais influenciada pela adaptação do metabolismo individual das células à mudança no microambiente que as cerca do que pelos fatores genéticos. Além disso, preconizam que o desenvolvimento dos biofilmes deve ser continuamente estudado, e que ainda está longe de ser totalmente compreendido (MONDS; O'TOOLE, 2009).

Elucidar a formação de biofilmes e o QS, bem como obter informações moleculares detalhadas sobre esses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de métodos para o controle da adesão bacteriana (HORI & MATSUMOTO, 2010; STEENACKERS et al., 2012).

3.1.2 Importância para indústria de alimentos

Muitas contaminações ou recontaminações ocorrem em diferentes indústrias de alimentos. A maioria delas está relacionada à formação de biofilmes e diversos micro-organismos deteriorantes ou patogênicos são associados a este problema (CASALINI, 2008; SHI & ZHU, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

As atividades dos biofilmes para a indústria de alimentos podem ser classificadas como benéficas ou prejudiciais. Dentre os benefícios estão a produção

de fermentados, o tratamento de efluentes e de água potável e a produção de biopolímeros para usos diversos (CASALINI, 2008). Já em relação aos prejuízos para a indústria, além da degradação dos alimentos e redução do tempo de prateleira, os biofilmes são importantes devido à sua formação em utensílios e superfícies, fonte crônica de contaminação e à dificuldade em sua remoção.

Os biofilmes também são uma ameaça à saúde pública quando presentes em alimentos não industrializados como brotos, vegetais frescos e frutos. Por vezes a contaminação ocorre durante o transporte e embalagem, mas também existem relatos de micro-organismos aderidos ou incorporados aos produtos íntegros (STEENACKERS et al., 2012; SREY et al., 2013). *Salmonella* por exemplo, pode contaminar frutas, legumes e verduras por meio de dejetos na água ou solo oriundos de fertilização com adubo animal contaminado ou más condições sanitárias e de tratamento de águas residuais (CORCORAN, 2013). E a partir desta contaminação inicial permanecer aderida aos alimentos na forma de biofilme.

Assim como nos vegetais consumidos crus, os biofilmes são de suma importância nos alimentos chamados RTE (*Ready-to-eat*), que não passam por nenhum processo de preparo que poderia inativar os micro-organismos que tenham se aderido em qualquer etapa do processamento. Com destaque aos patógenos *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (GARRIDO et al., 2009; SILAGYI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SREY et al., 2013).

Na indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e o desprendimento de porções aderidas eventualmente contamina os produtos (FLACH et al., 2005; CASALINI, 2008). Os gêneros mais relatados na formação de biofilmes nesse segmento da indústria são *Listeria* (WAAK et al., 2002), *Enterobacter* (SALO et al., 2006), *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* (SHARMA & ANAND, 2002; SREY et al., 2013). Os produtos lácteos podem também ser contaminados com *Salmonella* devido a práticas de ordenha com higiene deficitária (CORCORAN, 2013).

Na indústria de processamento de pescado e frutos do mar, além das superfícies dos equipamentos a qualidade da água está muito relacionada com a formação de biofilmes. Os principais micro-organismos relacionados são dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*, além de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (SREY et al., 2013).

A formação de biofilmes na indústria de processamento de carne bovina está relacionada ao inevitável acúmulo de matéria orgânica nas superfícies (SREY et al., 2013). Além disso, alguns autores têm observado maior prosperidade de biofilmes multiespecíficos, no caso da indústria de carne bovina formados por *E. coli* O157:H7 e *Acinetobacter calcoaceticus* (HABIMANA et al., 2010). Esse comportamento é citado também para outros micro-organismos e decorre da coagregação, conjugação e proteção contra compostos com atividade antimicrobiana devido à reunião dos recursos bioquímicos e da própria organização espacial das diferentes espécies (BURMØLLE et al., 2006; STEWART & FRANKLIN, 2008).

Nas indústrias de abate e processamento de aves muitos fatores de risco são relacionados à contaminação do produto final por patógenos e micro-organismos deterioradores de uma maneira geral, principalmente *Salmonella* que é uma bactéria patogênica de grande importância na cadeia produtiva de frangos de corte (MARIN et al., 2009). Além de *Salmonella*, outro patógeno importante na indústria de aves é *Campylobacter* (SREY et al., 2013), cuja habilidade de formação de biofilmes também já foi demonstrada (TRACHOO et al., 2002).

3.1.3 Biofilmes formados por *Salmonella* spp.

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae, com mais de 2.610 sorovares descritos (GUIBOURDENCHE et al., 2010). O gênero *Salmonella* consiste somente em duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (POPOFF et al., 2003, 2004; TINDALL et al., 2005).

Salmonella é um patógeno zoonótico comumente encontrado no trato gastrointestinal de animais de produção, domésticos e silvestres, existindo inúmeras maneiras deste micro-organismo contaminar os alimentos sendo que os de origem animal são os maiores responsáveis pela veiculação de *Salmonella*, especialmente os produtos avícolas (GREIG & RAVEL, 2009; CORCORAN, 2013).

Durante o abate de frangos, o extravasamento do conteúdo intestinal oriundo de aves portadoras pode atingir superfícies e acarretar contaminação cruzada. Além disso, *Salmonella* pode contaminar ovos durante a manipulação, quando na casca houver sujidades contaminadas ou infiltrar-se através de fissuras (CORCORAN, 2013). A contaminação dos ovos também pode ocorrer por transmissão vertical (transovariana), e mesmo na ausência de infecção intestinal é possível isolar *Salmonella* em ovários de poedeiras (BERCHIERI et al., 2001). Dada a importância epidemiológica que *Salmonella* tem para os alimentos e, em especial, para os produtos de origem avícola, sua ausência nos produtos finais é uma busca constante, porém a sua eliminação é difícil. Isto se deve, em grande parte, pela capacidade que *Salmonella* tem de se adaptar a diversos tipos de substratos e sobreviver a condições adversas por sua habilidade de formar biofilmes (CORCORAN, 2013). Para isso, existem quatro componentes principais na formação de biofilmes por *Salmonella*: fímbrias Curli, celulose, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos (LPS) (CORCORAN, 2013).

O apêndice denominado Curli, anteriormente chamado de “*thin highly aggregative fibers*” (Tafi), que numa tradução livre seriam fibras de agregação altamente finas, é um dos principais componentes da matriz de EPS (RÖMLING et al., 1998). As fímbrias Curli têm sido associadas a vários processos no desenvolvimento do biofilme, incluindo invasão do hospedeiro, colonização, contato célula-a-célula e motilidade (HOUDT et al. 2010; STEENACKERS et al., 2012). A expressão das fibras Curli é controlada pelo gene *csgD* (gene da subunidade Curli), organizado em dois operons *csgBAC* e *csgDEFG* (GERSTEL & RÖMLING, 2003) localizados no cromossomo (GRANTCHAROVA et al., 2010). O *csgD* foi previamente denominado *agfD* (*thin aggregative fimbria*) em *S. Typhimurium* (RÖMLING et al., 1998). Römling et al. (2000) após deleção do gene *csgD* observaram perda da capacidade de produção da matriz. No entanto, estudos posteriores conduzidos por Malcova et al. (2008) demonstraram que as fímbrias Curli e a celulose são importantes, mas não essenciais para a formação de biofilmes por *S. Typhimurium*. Estes autores observaram em 5% das estirpes uma estratégia alternativa para a formação de biofilmes dependente apenas da superprodução de polissacarídeo capsular.

A celulose é um polímero de glicose que desempenha um papel considerável na formação de biofilmes (SOLANO et al., 2002). A produção de

celulose é regulada pelo gene *adrA* (SOLANO et al., 2002), expressa a partir de um plasmídeo (ZOGAJ et al., 2001) e co-regulada pelo gene *csgD* (RÖMLING et al., 2003). Römbling (2002) sugere que a produção de celulose esteja sujeita a pressão seletiva e sob certas condições não ocorra, como por exemplo, em estirpes isoladas de doenças invasivas. Em *S. Weltevreden*, um sorotipo prevalente em surtos associados a consumo de frutos do mar, Bhowmick et al. (2011) observaram que o gene *gcpA* (que codifica uma proteína) é crucial para a síntese de celulose. Nesse estudo a expressão dos genes *csgD* e *adrA* também foi avaliada por PCR *real-time*, que nas baixas concentrações de nutrientes testadas foi menor do que a expressão do *gcpA* (BHOWMICK et al., 2011). Curli e celulose combinados formam a matriz dos biofilmes, ou o EPS (GERSTEL & RÖMLING, 2003), e pode haver interação entre a expressão de Curli e celulose dependendo das particularidades da célula ou substrato (GUALDI et al., 2008).

O polissacarídeo capsular é relacionado a persistência bacteriana no ambiente e diferentemente de Curli e celulose não está relacionado ao arranjo estrutural dos biofilmes (GIBSON et al., 2006). Apesar de ter um papel importante na formação de biofilmes, o polissacarídeo capsular não é necessário para a fixação de *S. enterica* em vidro e poliestireno (STEENACKERS et al., 2012; CORCORAN, 2013). Por último os lipopolissacarídeos, que além de desempenharem relevante função nas bactérias Gram negativas na forma planctônica, também atuam na formação de biofilmes (CORCORAN, 2013). A deleção de genes relacionados aos LPS resulta na diminuição da formação de biofilmes ou perda total dessa habilidade (KIM & WEI, 2009; CORCORAN, 2013).

Para identificação fenotípica dos componentes dos biofilmes, diversos autores analisam a morfologia das colônias em placas de ágar Luria-Bertani com adição de corantes indicadores (Vermelho Congo, Azul Brilhante Coomassie e Calcofluor) (RÖMLING et al., 1998; SOLANO et al., 2002; MALCOVA et al., 2008; STEENACKERS et al., 2012) que facilitam a detecção da celulose e das fímbrias Curli (RÖMLING et al., 1998).

3.2 Avaliação da formação de biofilmes em superfícies abióticas

Diversos ensaios baseados nas características fenotípicas têm sido descritos para a avaliação da formação de biofilmes. Os principais consistem em: avaliação da biomassa (quantificam a biomassa de células vivas e mortas), ensaios de viabilidade das células (contagem de micro-organismos e ensaios colorimétricos) e quantificação dos componentes específicos da matriz (PEETERS et al., 2008).

Um método muito utilizado na literatura é a avaliação de biomassa em microplacas de poliestireno de 96 poços (RODRIGUES et al., 2009; DÍEZ-GARCÍA et al., 2012; LIANOU & KOUTSOUMANIS, 2012; WANG et al., 2013), principalmente devido ao alto rendimento (podem ser avaliadas várias estirpes em uma única placa) e facilidade de utilização (CORCORAN, 2013). Nesse método os micro-organismos são cultivados numa placa de microtitulação à temperatura ideal na presença de nutrientes (preferencialmente caldo Luria-Bertani), de 2-28 dias (dependendo do modelo experimental). Em seguida, é realizada a medida da absorbância do biofilme após o uso de um corante indicador, em geral utiliza-se cristal violeta. Este método avalia condições estáticas, podendo não refletir as condições reais na indústria, onde um biofilme geralmente está em contato com um fluxo de líquidos e nutrientes (CORCORAN, 2013). Além disso, as propriedades da superfície das placas de microtitulação de poliestireno podem não refletir fielmente o aço inoxidável, o vidro e superfícies plásticas normalmente encontradas em indústrias de processamento de alimentos (HYDE et al., 1997).

A avaliação fenotípica de biofilmes pode ser relacionada com diversas características como, resistência aos antimicrobianos (PUFFAL, 2013) e sorotipo de *Salmonella* (DÍEZ-GARCÍA et al., 2012; WANG et al., 2013). Nos estudos de diferentes sorotipos, Wang et al. (2013) observaram que dentre aqueles isolados de um abatedouro de aves na China, quantidades relativamente altas de biofilme foram produzidas pelos isolados de *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Indiana*. Enquanto que Díez-Garcia et al. (2012) em amostras isoladas de carcaças de frango na Espanha encontraram maior habilidade de formação de biofilmes nos sorotipos *S. Agona* e *S. Typhimurium*.

As propriedades físico-químicas da superfície, em especial a hidrofobicidade, exercem influência sobre a adesão dos micro-organismos. A adesão microbiana melhora com o aumento da hidrofobicidade, tanto dos micro-organismos quanto do substrato (BRUINSMA et al., 2001). E o tempo de incubação é

inversamente proporcional à hidrofobicidade, ou seja, após 24h de crescimento a hidrofobicidade reduz (RODRIGUES et al., 2009).

Alguns estudos avaliaram a formação de biofilmes em diversas superfícies comumente encontradas em utensílios, maquinários e equipamentos nas instalações da indústria de alimentos (JOSEPH et al., 2001; VESTBY et al., 2009; PATEL & SHARMA, 2010). Algumas superfícies podem permitir a adesão de micro-organismos mais facilmente do que outras, por exemplo, Nguyen et al. (2014) demonstraram que a adesão de *S. Typhimurium* ao aço inoxidável foi maior do que ao acrílico (NGUYEN et al., 2014). Este dado diverge de uma informação bastante difundida de que a adesão ocorre mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais) (DONLAN & COSTERTON, 2002), mostrando falta de consenso em relação a essa característica.

Schlisselberg & Yaron (2013) num estudo de biofilmes em aço inoxidável observaram que o acabamento da superfície, além do tipo também colabora para a formação de biofilmes. Os resultados apontaram que a superfície mais polida além de proporcionar a formação do biofilme com menor altura foi mais facilmente desinfetada com cloro.

Além do aço inoxidável, os plásticos também são materiais bastante utilizados na indústria de alimentos, com destaque para o poliuretano e polipropileno, avaliados na presente pesquisa. Adicionalmente à utilização na indústria, o poliuretano (PU) junto com policloreto de vinil (PVC) compõe os principais materiais usados em sondas destinadas a alimentação enteral. Hurrell et al. (2009) observaram que *Cronobacter sakazakii*, sorotipos de *Salmonella* e outras espécies da família Enterobacteriaceae demonstraram habilidade de crescer em PU e PVC, o que atenta para o risco de infecções oportunistas em pacientes hospitalizados, especialmente neonatos.

A formação de biofilmes por isolados clínicos em polipropileno (PP) também tem sido avaliada, pois esse material é amplamente utilizado em fios de sutura empregados na correção de hérnias. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter cloacae* demonstraram capacidade de formar biofilmes em cultura pura ou com as três espécies combinadas (STOODLEY et al., 2012). Também tem sido demonstrado que anti-inflamatórios não esteroidais reduzem a formação de biofilmes por *S. aureus* e *E. coli* em fios de sutura de PP (REŚLIŃSKI et al., 2013).

Em indústrias de processamento de alimentos Jerônimo et al. (2012) observaram em *S. aureus* isolados de superfícies uma significativa habilidade de formação de biofilmes em PP. Flach et al. (2005) avaliaram a formação de biofilmes em PP em contato com leite e identificaram diversos fatores de virulência nos isolados que se aderiram e foram identificados.

Uma alternativa para evitar a formação de biofilmes em superfícies plásticas é alterar a confecção do material e incluir uma substância biocida no polímero. Laitman et al. (2014) avaliaram a inibição da adesão bacteriana acarretada pela modificação da superfície do PP por ozonólise seguida da inclusão de flúor vinílico no polímero. Quando o crescimento microbiano foi comparado com PP sem modificação, na superfície alterada foi observada redução de 86% em *E. coli* e 37% em *Listeria*. Também tem sido testados compostos específicos e protocolos combinados que atuem na eliminação dos biofilmes formados (STEENACKERS et al., 2012; SREY et al., 2013). No entanto, a melhor maneira de se controlar os biofilmes é a prevenção, aplicando-se adequadamente os procedimentos de higiene operacional (PPHO).

Alguns autores testaram a formação de biofilmes em diversas condições de incubação, diferentes temperaturas, pH e nutrientes. Galvão et al. (2012) testaram a habilidade de adesão de *Listeria monocytogenes* em diferentes concentrações de inóculo, disponibilidade de nutrientes, concentração de NaCl, tempo de incubação e pH. Não encontraram relação entre fatores estressantes e adesão. Contudo, estirpes de *Salmonella* Heidelberg isoladas de um abatedouro avícola formaram mais biofilmes em meio de cultivo sem adição do que em meio com adição de glicose (RODRIGUES et al., 2009). Como também já haviam comprovado Stepanović et al. (2004), *Salmonella* spp. produzem mais biofilmes em meios de cultura pobres em nutrientes enquanto *L. monocytogenes* produz mais em meios enriquecidos.

Em geral a bibliografia dispõe que a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. aumenta em condições desfavoráveis. Lianou & Koutsoumanis (2012) avaliando *S. enterica* isoladas de humanos e bovinos observaram maior formação de biofilmes em condições de pH, temperatura e concentração de NaCl menos favoráveis ao desenvolvimento desse micro-organismo. Resultados similares foram encontrados por Nguyen et al. (2014) que identificaram um aumento na formação de biofilmes com a elevação da temperatura e pH neutro.

Diversos ensaios avaliaram inibidores específicos dos biofilmes e um problema nesse tipo de estudo é a falta de uma metodologia padrão para avaliação das células viáveis. Apesar de ser amplamente utilizado, o ensaio com cristal violeta possui algumas limitações, avalia apenas a biomassa, não as células viáveis (SANDBERG et al., 2009). Nesse sentido, surgem os ensaios colorimétricos. Esses métodos podem ser empregados em células eucariotas de mamíferos (ROEHM et al., 1991; BERRIDGE et al., 2005), em leveduras ou bactérias especialmente após exposição a fatores estressantes como agentes antimicrobianos, sanitizantes entre outros (TSUKATANI et al., 2008; LAGHA et al., 2012a).

Uma das metodologias comumente empregadas é o uso de sais de tetrazólio. Os sais de tetrazólio são compostos orgânicos heterocíclicos de cor amarela que substituem o acceptor normal de elétrons (O_2) nos processos biológicos de redução (CARDOSO, 2004). São incorporados como marcadores colorimétricos de potencial redox nas células, penetram nos componentes celulares com atividade de desidrogenase como a mitocôndria por exemplo, e são convertidos a derivados de formazan de cor laranja (TELLIER et al., 1992; KUHN et al., 2003). Um dos sais mais usados é o 2,3-bis (2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamnocarbonil-tetrazolium) (XTT). Em células metabolicamente ativas o XTT é reduzido através da aceitação de elétrons por ação enzimática (de substâncias do sistema de transporte de hidrogênio), ou por ação química (de transportadores de elétrons artificiais) (KUHN et al., 2003). Os transportadores de elétrons artificiais utilizados comumente são a menadiona ou metasulfato de fenazina e têm como função promover a reação entre as células e o sal utilizado (TELLIER et al., 1992).

Os derivados de formazan são solúveis em água, sendo relativamente simples a sua quantificação por inspeção visual ou espectrofotometria em sobrenadantes celulares. Este aspecto é importante no estudo de biofilmes, porque permite efetuar estudos de suscetibilidade e de avaliação de atividade celular, sem que para tal seja necessário haver destruição da sua estrutura (CARDOSO, 2004). O XTT tem sido amplamente utilizado para avaliação do efeito antifúngico de diferentes compostos sobre a levedura *Candida*, seja na forma planctônica ou séssil (KUHN et al., 2003; CARDOSO, 2004; HONRAET et al., 2005; BETTIO, 2010; PIVA et al., 2011). Em ensaios com *Salmonella*, o XTT foi utilizado por Lagha et al. (2012b) e Abdallah et al. (2014) para quantificar o biofilme formado em microplacas de poliestireno em substituição ao tradicional cristal violeta. No entanto, é necessário

cautela ao traçar comparações na atividade metabólica entre estirpes ou espécies de micro-organismos, devido às suas sensibilidades individuais aos sais de tetrazólio (BETTIO, 2010).

3.3 Resistência de biofilmes de *Salmonella* spp. frente a fatores estressantes

3.3.1 Tolerância a desinfetantes

Segundo a Portaria 101 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA de 11 de agosto de 1993 (BRASIL, 1993):

O termo "desinfetante" é comumente empregado para designar substâncias capazes de destruir micro-organismos patogênicos não esporulados em curto espaço de tempo, quando aplicado a objetos inanimados. Sanitizantes são desinfetantes que reduzem o número de micro-organismos a níveis considerados seguros para a saúde pública, porém como a grande maioria dos produtos comercializados encontra-se rotulado como "desinfetante" qualquer germe patogênico que se mostrar resistente ao desinfetante na maior diluição recomendada pelo fabricante é motivo de reprovação.

Nesta Portaria também estão as recomendações para a verificação da eficácia dos desinfetantes, sendo utilizados nesses testes fontes de matéria orgânica para melhor reprodução das condições de uso (BRASIL, 1993). No entanto, somente são avaliados micro-organismos na forma planctônica, não são testados os biofilmes.

Para ser considerado eficaz um sanitizante usado em suspensão deve reduzir a população bacteriana em $5 \log_{10}$ (RIAZI & MATTHEWS, 2011). Em células aderidas a uma superfície, Møretrø et al. (2009) afirmam que é necessária uma redução de pelo menos $4 \log_{10}$.

Quando comparado o estilo de vida das células bacterianas de *Salmonella* spp., observou-se que as planctônicas são mais sensíveis a sanitizantes do que as sésseis (JOSEPH et al., 2001). Em outro estudo, comparando a exposição constante (durante 144h) de células planctônicas e sésseis, os autores também observaram uma maior adaptação e sobrevivência das células aderidas (MANGALAPPALLI-ILLATHU et al., 2008).

Outros autores correlacionaram diferentes condições de incubação (superfície, temperatura e idade do biofilme) para formação de biofilmes com a resistência aos sanitizantes (NGUYEN & YUK, 2013). Foi observado que a superfície não teve efeito sobre a resistência aos sanitizantes e o pH e a temperatura foram dependentes da idade do biofilme. O'Leary et al. (2013) avaliando *S. Typhimurium* isoladas de suínos notaram que estirpes que facilmente formaram biofilmes nas superfícies testadas (aço inoxidável e plástico) foram as que mais sobreviveram às altas concentrações de cloro.

Existem muitos métodos para avaliar a atividade dos desinfetantes. O método escolhido para uma pesquisa deverá simular situações reais. A maioria dos desinfetantes na concentração recomendada pelo fabricante é eficaz contra *Salmonella* em testes de suspensão. Contudo, diversos fatores podem reduzir o efeito de desinfecção, como a presença de matéria orgânica e a elevada densidade de células bacterianas que ocorre nos biofilmes (MØRETRØ et al., 2012).

Vale ressaltar que nos testes para verificação de eficácia de desinfetantes Cerf et al. (2010) propõem a utilização do termo “tolerância” em substituição a “resistência” devido às diferenças em relação aos testes com antimicrobianos. Embora biocidas e antimicrobianos tenham particularidades distintas, em se tratando da resistência dos biofilmes alguns mecanismos se aplicam a ambos (GILBERT et al., 2002) e serão abordados com mais detalhes no próximo item.

3.3.2 Resistência a antimicrobianos e produção ESBL

A alta prevalência de estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos de origem animal resistentes a antimicrobianos tem sido relatada no mundo inteiro. Como visto anteriormente, *Salmonella* é um dos principais agentes causadores de gastroenterite de origem alimentar resultando, em sua maioria, em uma diarreia auto-limitante não necessitando de tratamento antimicrobiano. Contudo, a antibioticoterapia torna-se necessária quando ocorre a disseminação pela corrente sanguínea e complicações como meningite, mais comumente em crianças, idosos e imunocomprometidos sendo as fluoroquinolonas e as cefalosporinas os agentes de eleição (MIRIAGOU et al., 2004).

A resistência de biofilmes microbianos a uma vasta variedade de agentes antimicrobianos está claramente associada com a organização das células bacterianas dentro da matriz polimérica. Essa organização reduz a penetração do agente antimicrobiano no biofilme. Ainda, as células sob condições de estresse, em taxas de crescimento lento e restrição de nutrientes podem expressar fenótipos relacionados a mecanismos de resistência aos antimicrobianos (GILBERT et al., 2002). Isto se deve à troca de material genético entre as bactérias, especialmente genes que codificam a resistência a antimicrobianos já que nos biofilmes a multiplicação é menor, mas a taxa de conjugação é maior (GHIGO, 2001).

Adicionalmente, foi sugerido que a taxa de crescimento lento de algumas células no interior do biofilme não decorre somente da limitação de nutrientes e sim devido à resposta ao estresse induzido pela elevada densidade celular (MAH & O'TOOLE, 2001). Essa teoria está relacionada ao aumento da expressão do fator sigma da RNA polimerase (RpoS), descrito especialmente em enterobactérias como *Salmonella* spp. e *E. coli*, que originalmente acreditava-se estar envolvido apenas com a fase de crescimento estacionária (MAH & O'TOOLE, 2001; DODD & ALDSWORTH, 2002). No entanto, estudos posteriores sugeriram que o RpoS é induzido pela densidade celular elevada (LIU et al., 2000), condição que ocorre nos biofilme por exemplo (MAH & O'TOOLE, 2001). O RpoS controla a expressão de mais de 40 genes e operons. Estes incluem genes envolvidos na resistência ao estresse, responsáveis pela adaptação ácida exibida por alguns patógenos e também podem expressar proteção cruzada para outras condições de estresse como temperatura, irradiação, biocidas e antimicrobianos (DODD et al., 2007; PEREZ, 2008).

A maior resistência aos antimicrobianos de células aderidas em relação as livres é verificada em diferentes espécies bacterianas, em *Staphylococcus coagulase negativa* (CERCA et al., 2005), *Klebsiella pneumoniae* (ANDERL et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (BROOUN et al., 2000) entre outras. Embora os mecanismos moleculares responsáveis por essa resistência não estejam completamente elucidados, em *Escherichia coli* alguns estudos sugerem a influência de bombas de efluxo nesse processo (MAIRA-LITRAN et al., 2000). Acredita-se que originalmente o mecanismo de efluxo foi induzido por diferentes desinfetantes (MØRETRØ et al., 2012). Devido a diferença de resistência observada em células livres e aderidas, alguns autores sugerem um mecanismo de resistência adaptável,

em vez de uma alteração genética propriamente dita (BROOUN et al., 2000; STEWART & COSTERTON, 2001; STEWART, 2002).

Há também a teoria das células persistentes, que seria uma fração pequena de células num estado altamente protegido, semelhante a esporos (STEWART & COSTERTON, 2001). Concedendo resistência aos antimicrobianos e aos desinfetantes. Fato que explicaria também a diferença de sensibilidade nas células planctônicas e sésseis, já que a frequência de células persistentes nos biofilmes é mais elevada (STEWART, 2002).

Em *Salmonella*, quando avaliada a relação da resistência a antimicrobianos com a formação de biofilmes, Puffal (2013) constatou que a maioria (89,4%) das estirpes envolvidas em surtos no sul do Brasil e nove de outros países que mostraram resistência a pelo menos um antimicrobiano foi capaz de formar biofilme. Malcova et al. (2008) afirmam que a presença da ilha genômica 1 (SGI1) em *Salmonella*, além da resistência a antimicrobianos também aumenta o potencial de formação de biofilmes. Enquanto que Wang et al. (2013) avaliando *Salmonella* isoladas de carcaças e de superfícies de contato em plantas processadoras, não encontraram uma correlação positiva entre a formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos. Constataram que a formação de biofilmes foi dependente das condições de incubação. Outros estudos defendem que concentrações sub-inibitórias de desinfetantes levem a um pequeno, mas estatisticamente significativo aumento no isolamento de estirpes de *Salmonella* multirresistentes (RANDALL et al., 2004; RANDALL et al., 2007).

Assim como os testes com sanitizantes, na maioria dos ensaios realizados com antimicrobianos são avaliadas somente as células em suspensão. As pesquisas com antimicrobianos em *Salmonella* spp. frequentemente investigam a resistência frente a fluoroquinolonas e nas últimas duas décadas tem se dado ênfase à produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) (THRELFALL, 2002; LI et al., 2007). Geralmente a resistência a cefalosporinas em Enterobacteriaceae é devido à produção de beta-lactamases de amplo espectro, tais como ESBL e beta-lactamase AmpC (JONG et al., 2014). O termo ESBL refere-se a qualquer beta-lactamase, geralmente adquirida e não intrínseca a uma espécie, que pode rapidamente hidrolisar ou conferir resistência a uma oximino-cefalosporina, ou qualquer beta-lactamase mutante que tenha uma atividade semelhante (MIRIAGOU et al., 2004; LIVERMORE, 2008; NOGUEIRA-MIRANDA et al., 2012).

Estudos sobre a produção de ESBL por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* isolados de amostras clínicas de humanos são amplamente realizados, devido à falta de sucesso terapêutico para esses micro-organismos não restrito às cefalosporinas. Isso ocorre, pois os genes de resistência são transmitidos por plasmídios que frequentemente carregam também genes de resistência a outros antibióticos como fluoroquinolonas (BONNET et al., 2001; SOULI et al., 2010; CRÉMET et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; OLIVEIRA, 2013; NOGUEIRA et al., 2014). Outros autores relatam a presença de ESBL em micro-organismos isolados a partir de produtos alimentícios (STUART et al., 2012; RYU et al., 2012; OJER-USOZ et al., 2013). No entanto, segundo Blanc et al. (2006) em *E. coli* e *Salmonella* spp. essa pesquisa teve início posteriormente. Alguns autores descrevem a produção de ESBL por *Salmonella* spp. isoladas de animais (BLANC et al., 2006; DIERIKX et al., 2010; WASYL & HOSZOWSKI, 2012; CLEMENTE et al., 2014; JIANG et al., 2014), sendo menos frequentes os relatos em produtos de origem animal (HASMAN et al., 2005; CLEMENTE et al., 2013; EGERVÄRN et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpes testadas

As 98 estirpes foram isoladas em um estudo prévio conduzido por Viana (2014) de esteiras transportadoras em salas de corte de plantas processadoras de aves habilitadas para exportação localizadas no estado do Paraná e com abate diário superior a 160 mil aves. Para a pesquisa de *Salmonella* nas superfícies das esteiras foram utilizadas esponjas (Nasco Whirl-Pak™) pré-hidratadas com 10 mL de solução salina peptonada 0,1% e uma área de 400 cm² foi amostrada. A detecção de *Salmonella* seguiu a metodologia recomendada pela Food and Drug Administration (FDA – USA), publicada no *Bacteriological Analytical Manual* (ANDREWS & HAMMACK, 2007). A confirmação de gênero foi realizada por meio de testes bioquímicos, sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR seguiu protocolo conforme Almeida et al. (2014). As diferentes origens são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Amostras de *Salmonella* sp. utilizadas no estudo conforme a sala de corte de origem, tipo de esteira e aspersão de água.

Sala de corte	Esteira		Total
	Lisa	Modular	
1	11	15	26
2	13	10	23
3	7	12	19
4	17	13	30
Total	48	50	98

4.2 Formação de biofilmes em placas de poliestireno

Para o teste de formação de biofilmes em poliestireno cada estirpe foi reativada em caldo infusão de cérebro e coração BHI (Difco™) e incubada a 37°C

por 24h, submetida à diluição até 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) utilizando-se caldo Luria-Bertani LB (Difco™). Quatro alíquotas de 200 µL foram semeadas em quatro poços em microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Nest®), procedimento realizado para cada estirpe em estudo. Além disso, cada placa possuía oito poços controles, sendo quatro inoculados com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e quatro constituídos de meio de cultura não inoculado. As microplacas foram incubadas por 96 horas a 35°C. Em seguida a placa foi lavada três vezes com solução salina tamponada PBS (pH 7,2), secada a temperatura ambiente e corada com cristal violeta 1% por 15 minutos. Foram realizadas três novas lavagens, agora com água destilada, e secagem em temperatura ambiente para, em seguida, serem submetidas a observação em leitora de microplacas (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura de 540 nm. Para avaliar os resultados de absorbância, adaptado de Stepanović et al. (2000), a média da densidade óptica dos quatro poços de cada amostra (Doa) foi comparada com a média da absorbância dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2.Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2.Docn < Doa \leq 4.Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4.Docn < Doa$).

4.3 Formação de biofilmes em poliuretano e polipropileno

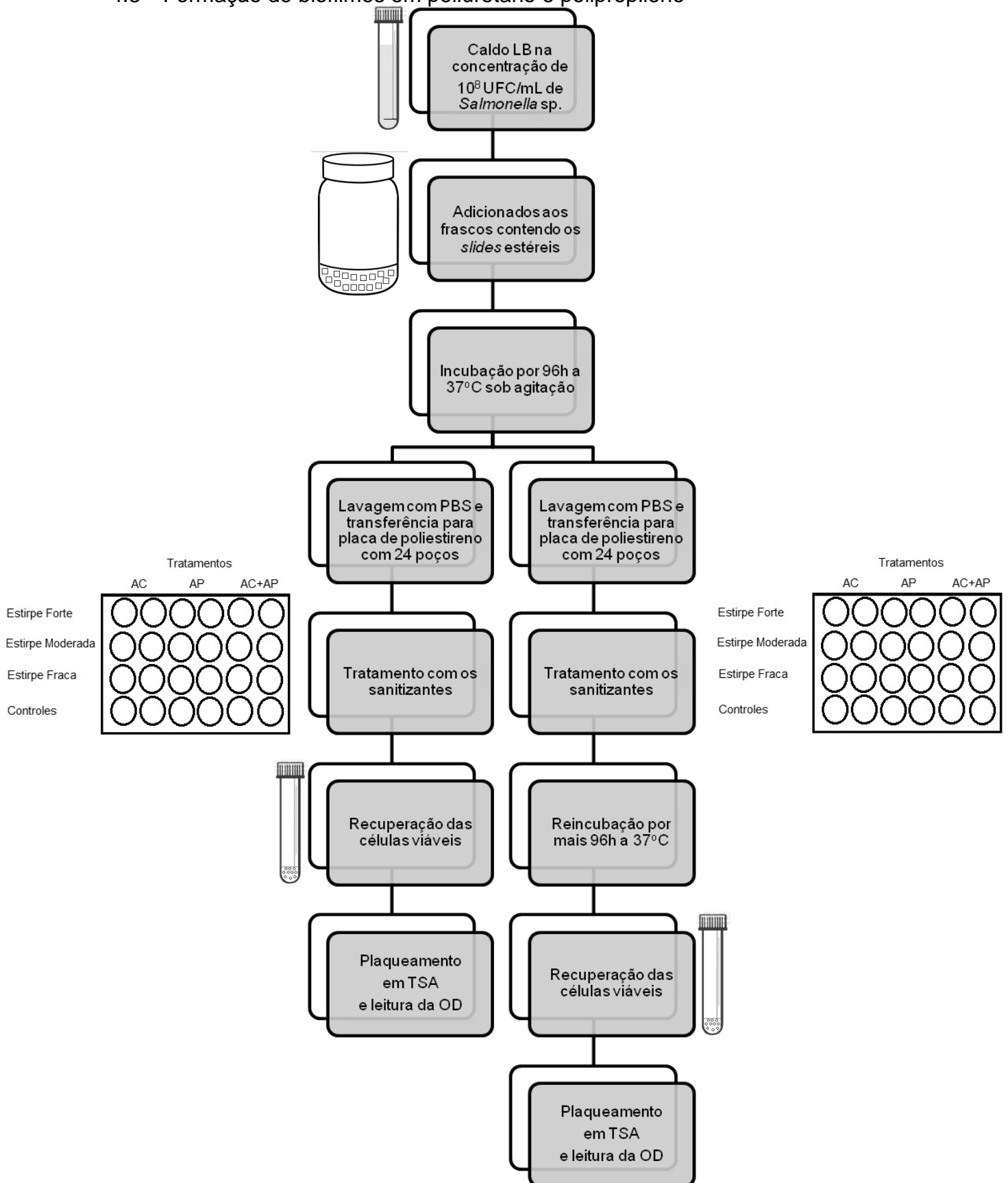


Figura 1 - Fluxograma da metodologia empregada para avaliar a formação de biofilmes em PU e PP seguido do desafio com sanitizantes e recuperação das células viáveis.

Para cada uma das estirpes de *Salmonella* testadas no estudo de formação de biofilmes em PP e PU, foram realizadas três repetições e cada análise foi realizada em duplicata em cada um dos tempos 5, 10, 15, 30 no PU e 5, 10, 15 no PP. Em que: poliuretano (PU), polipropileno (PP), alcalino clorado (AC), ácido peracético (AP) e alcalino clorado com ácido peracético (AC+AP).

O fluxograma da metodologia empregada para avaliar a formação de biofilmes em PU e PP seguido do desafio com sanitizantes e recuperação das células viáveis está representado na Figura 1.

O poliuretano (PU) e o polipropileno (PP) são os materiais utilizados para fabricar as esteiras transportadoras das salas de corte, de onde as estirpes bacterianas foram isoladas (Figura 2). O PU compõe as esteiras lisas e o PP as modulares.

Slides de 1 cm² de PU e PP foram seccionados, lavados e autoclavados em frascos com 10 mL de caldo LB (Difco™). Como os *slides* tinham três dimensões, e por isso o biofilme poderia se formar em todos os lados, foi calculada a área total de cada *slide*, que era 2,4 cm² para o de PP e 2,8 cm² para o de PU. O valor da área do *slide* foi utilizado para a conversão das contagens em placa em UFC/cm².

Nessa etapa do estudo foram selecionadas três estirpes, uma de cada grau de classificação na formação de biofilmes em poliestireno. Um volume de 15 mL de caldo LB na concentração de 10⁸ UFC/mL equivalente a 0,5 na escala de MacFarland foi adicionado aos frascos contendo os *slides* estéreis. Para a formação de biofilmes os frascos foram mantidos por 96h a 37°C sob agitação de 100 RPM em Orbital Shaker (BIOSAN®). Adicionalmente um frasco contendo os *slides* estéreis e sem inóculo era incubado para ser utilizado como controle negativo.

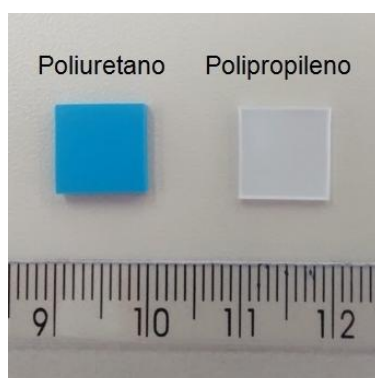


Figura 2 - *Slides* de Poliuretano (PU) e Polipropileno (PP) utilizados para testar adesão *in vitro* das estirpes de *Salmonella* sp.

4.3.1 Tratamento com sanitizantes

Após realização do protocolo de formação de biofilmes conforme descrito no item 4.3, foi feita a transferência dos *slides* de PP e PU para uma placa de poliestireno de 24 poços (NEST[®]) e a lavagem com PBS para remoção das células planctônicas, os *slides* foram tratados com 1 mL dos sanitizantes em três tratamentos:

- Tratamento AC: Detergente alcalino clorado Sanifoam[®] (A&B) a 4%;
- Tratamento AP: Ácido peracético Peracid[®] (A&B) 0,2%;
- Tratamento AC+AP: inicialmente Sanifoam[®] (A&B), removido para posteriormente desafiar o biofilme formado com o Peracid[®] (A&B).

Os tempos de contato dos slides com os desinfetantes foram 5, 10 e 15 minutos. Para os *slides* de PU utilizou-se adicionalmente o tempo de 30 minutos. As concentrações utilizadas seguiram as recomendações dos fabricantes (Apêndices A e B). Cada placa era feita em duplicata, uma para recuperar as bactérias dos *slides* no dia do tratamento e outra, após acréscimo de 1 mL de caldo LB (Difco[™]) e nova incubação por mais 96h a 37°C. Em cada placa havia seis poços controle, três controles negativos (um para cada tratamento) e três controles positivos (um para cada estirpe).

4.3.2 Quantificação de micro-organismos viáveis

Para a remoção das células viáveis dos *slides* foi utilizada uma metodologia adaptada de Nguyen & Yuk (2013) onde tanto os *slides* sem tratamento (controle positivo), quanto os tratados, foram transferidos para tubos de ensaio (180x20 mm) contendo 5 mL de solução salina e 20 a 25 esferas de vidro estéreis de 0,4 e 0,5 mm de diâmetro. Os tubos foram mantidos no *vortex* por 3 minutos com o objetivo de se extrair as células de *Salmonella* aderidas ao *slide*. Posterior a isso, os tubos do controle positivo eram diluídos em solução salina na proporção 1:100 para possibilitar a contagem em placa de ágar TSA (Difco[™]). Os tubos com os *slides* tratados com os sanitizantes, após a agitação em *vortex* tiveram 100µL semeados em superfície (*spread plate*) em ágar TSA (Difco[™]) para a contagem de micro-

organismos formadores de biofilme que ainda permaneceram viáveis. A mesma metodologia era realizada com os *slides* com mais 96h de incubação, com a diferença que nestas quando observada previamente a turvação no poço, eram utilizadas adicionalmente placas de ágar XLD (Difco™) para assegurar que não houve qualquer contaminação durante o processo.

Também foram transferidos 100 µL de cada tubo após agitação em *vortex* para uma placa de poliestireno de 96 poços (NEST®) para posterior avaliação colorimétrica com 50 µL XTT *sodium salt* - ≥90% a 5 mg/mL, sinônimo de 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide *inner salt* (Sigma-Aldrich®) e 4 µL de Menadiona (Sigma-Aldrich®) a 1mM incubados sob agitação de 70 RPM em Orbital Shaker (BIOSAN®) por 4h a 35°C. A diluição e os cuidados necessários com XTT e a Menadiona foram segundo Chandra et al., (2008). E a leitura realizada em leitora de microplacas Polaris (Celer®) a 492 nm.

Para avaliar os resultados de absorbância, adaptado de Stepanović et al. (2000), da mesma maneira que realizado nos biofilmes em poliestireno, a média da densidade óptica dos poços de cada combinação de tratamento (Dot) foi comparada com a média da absorbância dos controles negativos (Docn). Para determinar a diferença entre as combinações e o controle negativo foi utilizada a seguinte classificação: ausente ($\text{Dot} \leq \text{Docn}$), fraca ($\text{Docn} < \text{Dot} \leq 2 \cdot \text{Docn}$), moderada ($2 \cdot \text{Docn} < \text{Dot} \leq 4 \cdot \text{Docn}$) e forte ($4 \cdot \text{Docn} < \text{Dot}$).

As médias das contagens em placa em \log_{10} (UFC/cm²) e das leituras de OD foram submetidas à análise de variância (fatorial triplo) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O *software* utilizado foi o Genes (CRUZ, 2006).

4.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada segundo as normas M31-A3 (CLSI 2008) e M100-S23 (CLSI 2013) do Clinical and Laboratory Standards Institute para disco-difusão em ágar. Foram testados 18 agentes antimicrobianos de sete classes distintas: (1) beta-lactâmicos divididos em 3 subclasses: penicilínicos: ampicilina (AMP; 10 µg), cefalosporínicos: cefaclor (CFC; 30 µg) e ceftiofur (CTF; 30

µg) e carbapenêmicos: meropenem (MER; 10 µg) e imipenem (IPM; 10 µg); (2) aminoglicosídeos: estreptomicina (EST; 10 µg), tobramicina (TOB; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), amicacina (AMI; 30 µg) e neomicina (NEO; 30 µg); (3) quinolonas: enrofloxacin (ENO; 5 µg), ácido nalidíxico (NAL; 30 µg) e ciprofloxacina (CIP; 5 µg); (4) sulfonamida e trimetoprim: sulfa/trimetoprim (SUT; 25 µg); (5) tetraciclina: tetraciclina (TET; 30 µg); (6) fenicóis: cloranfenicol (CLO; 30 µg) e florfenicol (FLF; 30 µg) e (7) polimixinas: polimixina B (POL, 300 UI). Foram consideradas multirresistentes as estirpes que mostraram fenótipo resistente a pelo menos três classes antimicrobianas testadas (NGOI; THONG, 2013). Como controle de qualidade do teste foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922.

A produção da enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) foi avaliada pelo método de disco-difusão dupla (PITOUT et al., 2003). O disco central utilizado foi amoxicilina mais ácido clavulânico (AMX/AC; 20/10 µg). Em um raio de 20 mm a partir do centro deste foram colocados quatro discos, dois de cefalosporinas de terceira geração: cefadizima (CAZ; 30µg) e ceftriaxona (CRO; 30µg); uma cefalosporina de quarta geração: cefepime (CPM, 30µg); e um monobactâmico: aztreonam (ATM; 30µg) (SOUSA JUNIOR et al., 2004). O controle de qualidade foi realizado com a estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922. As amostras foram consideradas positivas quando as zonas de inibição em torno de qualquer cefalosporina foram aumentadas na direção do disco com ácido clavulânico e quando o halo de inibição em torno de pelo menos uma das cefalosporinas foi inferior a 19 mm (EUCAST, 2013).

A análise estatística para explorar a associação entre o isolamento de estirpes ESBL positivas e a sala de corte de origem foi realizada pelo teste Qui-quadrado num intervalo de confiança de 95%, utilizando o *Statistical Analysis Package* (SAS). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.5 Pesquisa de genes relacionados à formação de biofilmes

As estirpes de *Salmonella* sp. foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35°C por 24h. Após a incubação 1mL foi transferido para um microtubo estéril e centrifugado a 10.000 x g durante 1 minuto. O sobrenadante foi dispensado e o

pellet ressuspenso em 200µL de água MilliQ estéril. O microtubo foi homogeneizado em vórtex por 30 segundos e posteriormente aquecido em banho maria a uma temperatura média de 95°C por 10 minutos. Em seguida o microtubo foi novamente centrifugado a 10.000 x g durante 1 minuto. O sobrenante, que consistia no DNA molde, foi transferido para um novo microtubo.

A PCR duplex foi realizada em um volume total de 25 µL: 2,5 µL de tampão 10X, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 200 mM de cada dNTP (Ludwig Biotec), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), 10 pmol de cada *primer* (Tabela 2), água destilada ultrapura qsp (Invitrogen™), e 3 µL de DNA. A PCR foi realizada em um termociclador Veriti 384-well Thermal Cycler (Applied Biosystem). Ciclo inicial de 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 94°C/30 s, 60°C/30 s, e 72°C/30 s. A temperatura para extensão final foi 72°C/4 min. Como controle negativo foi utilizado água destilada ultrapura e como controle positivo a estirpe de referência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Foram utilizados pares de *primers* para os gene *csgD* e *adrA* desenhados por Oliveira et al. (2014). Estes autores utilizaram o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>), número de acesso: NC 0031971, para o gene *csgD* 1252660, intervalo: 1229728–1230378 e para o gene *adrA* 1251904; intervalo: 438129–439241.

A visualização do produto da PCR foi realizada em cuba de eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 - Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) usando gel de agarose (2% Ludwig Biotec) em tampão de Ácido Bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™). Os fragmentos de DNA foram comparados com marcadores de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec) e a imagem foi capturada em analisador de imagens (AlphaMager®).

Tabela 2 - Sequência 5' – 3' e pb dos *primers* *csgD* e *adrA* utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	pb
<i>csgD</i> F	TGCGGACTCGGTGCTGTTGT	123
<i>csgD</i> R	CAGGAACACGTGGTCAGCGG	
<i>adrA</i> F	GGCGGCGCAAAGCCCTTGAT	92
<i>adrA</i> R	GCCCATCAGCGCGATCCACA	

4.6 Microscopia eletrônica de varredura para visualização do biofilme

Para observação em microscópio eletrônico de varredura foram selecionados *slides* de cada material utilizado na formação de biofilme (PP e PU) sem inóculo e com biofilme formado por uma estirpe classificada como fortemente formadora de biofilmes em poliestireno.

Foram realizados dois tipos de fixação do biofilme nos *slides*. Ambos foram fixados em glutaraldeído a 3% diluído em solução salina tamponada PBS (pH 7,2) e um *slide* de cada material foi posteriormente desidratado com acetona.

As amostras foram submetidas ao Centro de Microscopia Eletrônica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR - Curitiba. Após a obtenção do ponto crítico e cobertura com ouro foi realizada a caracterização topográfica das superfícies por meio do microscópio eletrônico de varredura modelo VEGA 3 (Tescan[®]) sob uma aceleração de 15 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Habilidade de formação de biofilmes e tolerância a sanitizantes industriais por *Salmonella* sp.

Todas as 98 estirpes de *Salmonella* sp. testadas foram positivas para os genes *csgD* e *adrA* (Figura 3). Estes resultados são semelhantes aos de Dantas (2013), Oliveira et al. (2014) e Vivian (2014) que também encontraram os genes *csgD* e *adrA* em todas as estirpes de *Salmonella* testadas. Embora existam resultados consistentes sobre a existência de genes específicos para a formação e sinalização dos biofilmes como os genes *csgD* e *adrA* por exemplo, não é possível afirmar somente pela análise molecular, sem uma observação das condições ambientais, que as estirpes de fato, formam biofilmes (MONDS & O'TOOLE, 2009). Além disso, outros genes, além dos pesquisados neste estudo podem ser identificados em biofilmes formados por *Salmonella* (HERMANS et al., 2011).

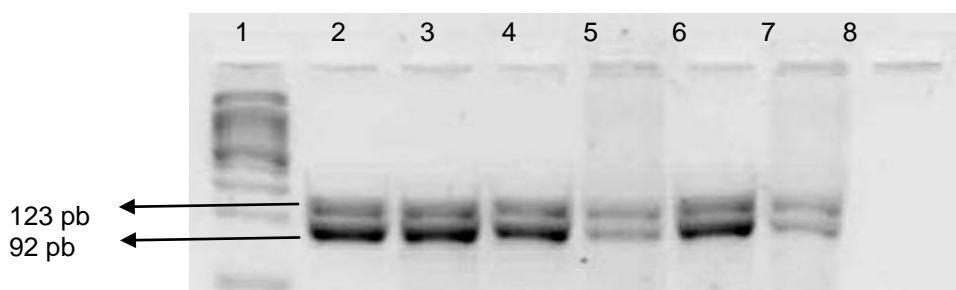


Figura 3 - Amplificação da PCR para detecção dos genes *csgD* (123pb) e *adrA* (92 pb). Coluna 1: marcador de peso molecular de 50pb, 2: controle positivo *S. Typhimurium* ATCC 14028, 3 a 7: amostras, 8: controle negativo.

Neste estudo todas as estirpes demonstraram habilidade de formar biofilmes nas placas de 96 poços de poliestireno. A estirpe de referência utilizada (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) demonstrou habilidade fraca. Somente uma estirpe, oriunda da esteira lisa com água foi fortemente formadora conforme a classificação sugerida por Stepanović et al. (2000). Oliveira et al. (2014) avaliaram a habilidade de *Salmonella* em formar biofilmes em diversos materiais e diferentes temperaturas. Observaram que 98,3% das estirpes formaram biofilmes em algum material em pelo menos em uma temperatura testada, e nenhuma estirpe foi fortemente formadora. A

maioria das estirpes avaliadas neste estudo (69) foram fracamente e 28 foram moderadamente formadoras de biofilmes.

A maior ou menor habilidade que as culturas microbianas têm em se aderir às superfícies está diretamente relacionada ao tipo de substrato (SHI & ZHU, 2009), sendo que a maioria dos estudos de biofilmes *in vitro* utiliza unicamente placas de poliestireno (RODRIGUES et al., 2009; DÍEZ-GARCÍA et al., 2012; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; WANG et al., 2013) como forma de avaliar esta habilidade. No entanto, na presente pesquisa foi verificada a capacidade de estirpes de *Salmonella* sp. em formar biofilmes em poliuretano (PU) e polipropileno (PP), que são os materiais que compõem as esteiras que transportam os cortes de carne nas plantas processadoras de aves, adicionalmente da verificação feita em poliestireno.

Foi avaliada a interação da classificação das estirpes de *Salmonella* sp. segundo a formação de biofilmes em poliestireno com a formação de biofilmes em PU e PP conforme pode ser evidenciado na Tabela 3. Observou-se que as três estirpes de *Salmonella* selecionadas de acordo com sua habilidade de formar biofilmes em poliestireno (fraca, moderada e forte) não apresentaram interação com os materiais (PU e PP), pois não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) tanto para a contagem em placa (96 e 192h) quanto para a densidade óptica (96h). Ou seja, a estirpe considerada fracamente formadora de biofilmes no poliestireno aderiu-se ao PU e ao PP da mesma forma que a fortemente formadora.

Quando observadas as médias de acordo com o tipo de material em 192 h de incubação, as contagens em \log_{10} no PP foram estatisticamente diferentes e maiores do que as contagens em PU, que sofreram redução quando comparadas com a incubação inicial de 96h. Isto indica que há diferenças importantes na adesão de *Salmonella* sp. no material comumente utilizado para estimar a formação de biofilmes *in vitro*, o poliestireno, e nos materiais utilizados nas plantas processadoras, o PU e o PP. Por estes resultados há indicação que é necessário ter cautela ao traçar comparações e extrapolar resultados entre materiais diferentes, devendo-se analisar cada situação em particular.

Tabela 3 - Médias em \log_{10} (UFC/cm²) com 96 e 192 h de incubação e densidade óptica (OD) somente com 96h de incubação a 35°C, conforme a classificação das estirpes de *Salmonella* sp. segundo a formação de biofilme em poliestireno e nos materiais das esteiras.

Biofilme	Log₁₀ (UFC/cm²)		OD
	96h	192h	96h
Fraca	6,21 ^{ns}	5,41 ^{ns}	0,200 ^{ns}
Moderada	6,16 ^{ns}	5,83 ^{ns}	0,190 ^{ns}
Forte	6,27 ^{ns}	5,80 ^{ns}	0,199 ^{ns}
Material			
PP	6,23 ^{ns}	6,18 ^a	0,215 ^{ns}
PU	6,20 ^{ns}	5,18 ^b	0,179 ^{ns}
Média	6,22	5,68	0,197
CV(%)	4,23	8,31	43,05

Em que ns: não significativo, CV: coeficiente de variação, PU: Poliuretano e PP: polipropileno. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística na comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando observada a densidade óptica com 192 h de incubação (Tabela 4), nota-se que houve interação entre a classificação da estirpe conforme a formação de biofilmes em poliestireno e os outros materiais testados. No PU as três estirpes testadas tiveram médias de OD sem variação estatisticamente significativa. Já as médias de leituras de OD no PP foram menores na estirpe fracamente formadora de biofilmes em poliestireno e maiores nas estirpes com habilidade moderada e forte. Dessa maneira pode-se inferir que o PP, material que compõe a esteira modular, se assemelha mais ao poliestireno nos testes de adesão *in vitro*, concordando que em alguns casos é possível correlacionar a formação de biofilme *in vitro* em microplacas de poliestireno com outras superfícies comumente encontradas em instalações alimentares (VESTBY et al., 2009; PATEL & SHARMA, 2010).

Tabela 4 - Médias das densidades ópticas (OD) de estirpes de *Salmonella* sp. conforme a habilidade de formação de biofilme em poliestireno e a interação desse fator com PU e PP em 192 h de incubação a 35°C.

Material	Biofilme		
	Fraca	Moderada	Forte
PU (OD)	0,170 ^{Aa}	0,179 ^{Ab}	0,185 ^{Ab}
PP (OD)	0,209 ^{Ba}	0,364 ^{Aa}	0,380 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferença estatística na comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação 38,62%.

As médias das contagens de *Salmonella* sp. no PU neste estudo foram superiores às obtidas por Chia et al., (2009) que foram $3,23 \log_{10}$ (UFC/cm²). Estes autores compararam a adesão de *Salmonella* em diversas superfícies usualmente empregadas na indústria de alimentos.

As contagens de *Salmonella* sp. aderidas aos *slides* sem tratamento com sanitizantes também foram úteis para demonstrar que a metodologia das esferas de vidro utilizada para a remoção das células viáveis cumpriu seu propósito adequadamente. Além desta metodologia podem ser utilizados *swabs* e sonicação para a remoção dos micro-organismos aderidos (LI et al., 2014), sendo que ambas podem subestimar as contagens, *swabs* devido à dificuldade de remover completamente as células aderidas, enquanto que a sonicação conforme tempo e intensidade utilizados podem romper as células (ASSÉRE et al., 2008).

Na Tabela 5 é demonstrada a média da contagem residual (\log_{10} UFC/cm²) das estirpes de *Salmonella* sp. em PU sem tratamento (controle) e desafiadas com sanitizantes (AC, AP e AC+AP) por tempo de contato. A recuperação das células viáveis foi realizada logo após o desafio com sanitizantes do biofilme incubado durante 96h. Embora nos resultados sem tratamento com sanitizantes (Tabela 3) a formação de biofilme após reincubação foi maior no PP do que no PU, fornecendo a impressão de que o PP foi o melhor material para a adesão de *Salmonella* sp., somente foram recuperadas células viáveis a partir dos *slides* de PU. Um dos motivos para esse resultado é a maior rugosidade dessa superfície em comparação com o PP (Figura 4). Nota-se que apesar da recuperação de células viáveis a partir dos *slides* de PU tratados com AP, houve uma redução de mais de $4 \log_{10}$, o que segundo Møretrø et al. (2009) é um valor adequado para considerar a eficácia de um sanitizante em células aderidas. As contagens residuais das células do biofilme formado por 96h e tratado com AC e AC+ AP não chegaram a níveis detectáveis. Dessa forma, na recuperação das células viáveis logo após o tratamento todos os sanitizantes testados foram eficazes.

Tabela 5 - Efeito dos tratamentos sobre o logaritmo das médias das contagens em placa do biofilme formado por *Salmonella* sp. em poliuretano com 96h de incubação a 35°C conforme os tempos testados.

Tempo (min)	log (UFC/cm ²)			
	Controle	AC	AP	AC+AP
5	6,12	0,00	1,42	0,00
10	6,17	0,00	0,68	0,00
15	6,16	0,00	0,45	0,00
30	6,00	0,00	1,31	0,00
Média	6,11 ^a	0,00 ^c	0,97 ^b	0,00 ^c

Letras diferentes na linha das médias indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação 61,67%. Os valores 0,00 correspondem à contagens inferiores ao limite de detecção de 1,25 log (UFC/cm²) do método utilizado.

Controle: contagens sem desafio com sanitizantes, AC: tratamento com alcalino clorado, AP: tratamento com ácido peracético e AC+AP: tratamento com uma combinação de ambos.

Para investigar a eficácia de desinfetantes no processamento de alimentos, Møretrø et al. (2012) preconizaram que os métodos aplicados mimetizem as condições reais. Para tornar o estudo *in vitro* realizado semelhante às condições reais de sanitização aplicadas na indústria, foram utilizados os mesmos materiais das esteiras onde se realizou o isolamento das estirpes de *Salmonella* sp. Adicionalmente foram utilizadas estirpes isoladas em plantas processadoras de aves em vez de estirpes de referência, e os sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos.

Na Tabela 6, ao observar as médias em log₁₀ após o desafio do biofilme formado em PU e a reincubação dos *slides* por mais 96h nota-se que as médias por tratamento foram diferentes estatisticamente. As médias do tratamento AP foram as maiores e, conseqüentemente, as que mais se aproximaram às médias do controle positivo e a maior redução do biofilme ocorreu nos tratamentos AC e AC+AP que não diferiram entre si. Quando comparadas as médias por tratamento ao longo do tempo de contato do sanitizante com o *slide*, não foram observadas variações estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Não houve interação dos sanitizantes testados com os tempos de contato ($p>0,05$), por que desde os 5 minutos o ácido peracético isoladamente demonstrou menor eficácia, mantendo o log₁₀ elevado nas médias dos demais tempos testados. Enquanto que os tratamentos com alcalino clorado isolado e em associação com o ácido peracético reduziram o log₁₀ já aos 5 minutos e mantiveram um efeito de redução constante nos demais tempos. Embora microbiologicamente 4,80 e 1,57 log₁₀ de UFC/cm², por exemplo, sejam consideravelmente diferentes, ao realizar o

tratamento estatístico dos resultados o coeficiente de variação obtido foi elevado (65,83%), resultando em uma diferença mínima significativa (DMS) de 3,67 \log_{10} (UFC/cm²).

Para melhor analisar o fator tempo, foi realizada uma comparação de médias com a exclusão do controle positivo, e nesta comparação observou-se que com o aumento do tempo de contato com os sanitizantes testados a média em \log_{10} diminuiu.

Tabela 6 - Efeito dos tratamentos sobre o logaritmo das médias das contagens em placa do biofilme formado por *Salmonella* sp. em PU com 96h de incubação, seguido de nova incubação por 96h (total 192h), conforme os tempos testados.

Tempo (min)	log (UFC/cm ²)				
	Controle	AC	AP	AC+AP	Média (sem controle)
5	4,62	1,57	4,80	2,21	2,86 ^a
10	5,20	1,56	2,73	1,24	1,84 ^{ab}
15	5,16	0,00	3,77	1,12	1,63 ^{ab}
30	5,32	0,54	1,57	0,00	0,70 ^b
Média	5,08 ^a	0,92 ^c	3,21 ^b	1,14 ^c	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação 65,83%. Os valores 0,00 correspondem à contagens inferiores ao limite de detecção de 1,25 \log (UFC/cm²) do método utilizado. Em que Controle: contagens sem desafio com sanitizantes, AC: tratamento com alcalino clorado, AP: tratamento com ácido peracético e AC+AP: tratamento com uma combinação de ambos.

Na análise da média dos tratamentos ficou evidente que os tratamentos AC e AC+AP foram estatisticamente iguais e reduziram as contagens de *Salmonella* em mais que 4 \log_{10} . Mesmo nas condições de reincubação do presente experimento, o sanitizante alcalino clorado demonstrou ser efetivo sobre células bacterianas aderidas, diferentemente do ácido peracético, cujas contagens reduziram somente 1,87 \log_{10} em relação à média do controle, uma redução menor do que a necessária para considerá-lo efetivo (MØRETRØ et al., 2009). Contudo, neste estudo só foi testada a concentração de 0,2% de AP, sendo que a recomendação de uso pode variar de 0,1 a 1,5%.

Esta variação observada nas contagens dos *slides* avaliados logo após o tratamento e os *slides* reincubados pode ser decorrente do estresse provocado pelos sanitizantes nas células de *Salmonella* o que as impede de formarem colônias em placa logo após o tratamento. Mas quando retornam a uma condição ótima de

incubação tornam-se viáveis novamente e formam colônias, fato que é mais um alerta para a realização adequada do Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) nas indústrias. Vale ressaltar que o PPHO das indústrias utiliza uma combinação de sanitizantes e água de enxágue em temperaturas elevadas, fator não avaliado neste experimento.

A injúria provocada pelo uso dos sanitizantes pode ter levado as estirpes de *Salmonella* a um estado viável mas não cultivável (VBNC). Peneau et al. (2007) em estudo que avaliou formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* em *slides* de cerâmica e tratados com alcalino clorado a 2% utilizaram um marcador de viabilidade chamado CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride). Estes autores argumentaram que algumas das células podem se dividir e formar microcolônias no *slide*, mesmo que não possam formar colônias visíveis em placas de TSA. E que estas células que respiram, se dividem e são marcadas pelo CTC de fato são células VBNC. Oliver (2005) relatou que as células tendem a entrar no estado VBNC em resposta a fatores estressantes como privação de nutrientes, incubação fora do intervalo de crescimento, exposição a agentes biocidas entre outros. E que diversos micro-organismos incluindo alguns patogênicos como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* já mostraram o estado VBNC. A partir dos resultados deste estudo é possível afirmar que a reincubação por 96h adicionais dos *slides* desafiados com sanitizantes possibilitou a reversão do estado VBNC em algumas células de *Salmonella*.

As contagens em placa dos *slides* de PP na sequência do desafio com os sanitizantes (96h) e após reincubação (192h) em todos os tempos e tratamentos testados não chegaram a níveis detectáveis. Um dos motivos para esses resultados foi a maior lisura da superfície do PP quando comparado ao PU (Figura 4), o que facilitou a remoção das bactérias aderidas. Vale ressaltar que essa afirmação provém da análise de um *slide* com 1 cm² e não pode ser completamente extrapolada para condições reais. Nesse caso, a conformação da superfície de contato com o alimento interfere na adesão bacteriana e principalmente na facilitação ou não da higienização.

Na análise do PU e do PP ao microscópio eletrônico de varredura com um aumento de 1000x (Figura 4: A e B) observa-se que a topografia do PU é mais rugosa que a do PP. Semelhante a imagem do PU obtida por Chia et al. (2009) por microscopia de força atômica. Naquele estudo, embora o PU aparentemente seja o

material mais rugoso, a adesão de *Salmonella* foi significativamente maior no Teflon®.

As imagens C e D são respectivamente do PU e PP com adesão de *Salmonella* sp. e fixação somente com glutaldeído 3% em um aumento de 1000x. As imagens E e F são do aumento de 10000x das imagens C e D. Em G e H (PU e PP respectivamente) com fixação em glutaldeído 3% seguido de acetona num aumento de 10000x observa-se a adesão de *Salmonella* sp. somente no PU. A etapa de preparo para a visualização com acetona pode ter removido as células de *Salmonella* sp. aderidas ao PP.

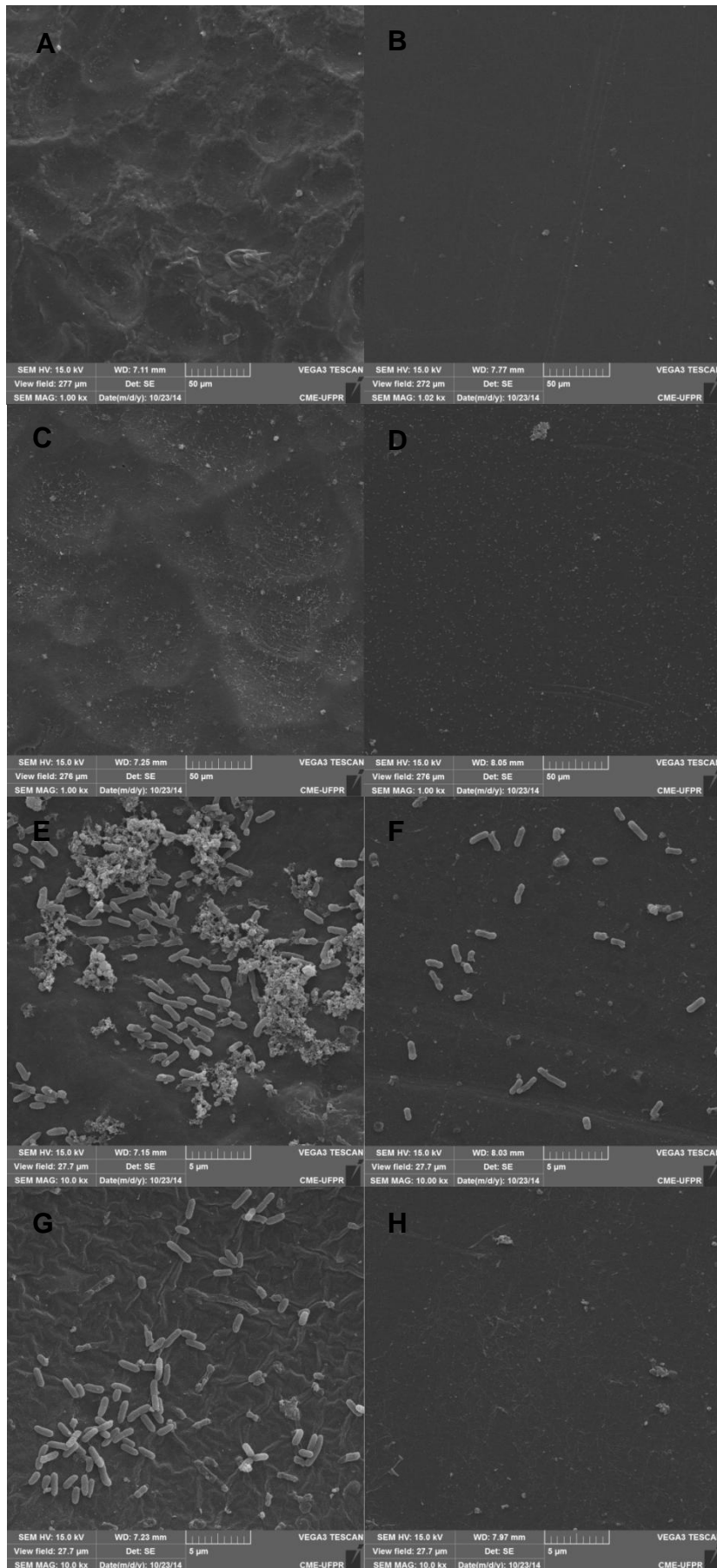


Figura 4 - Imagens obtidas por mev. Na esquerda poliuretano e na direita polipropileno. (A) e (B) sem inóculo, (C) e (D) com adesão de *Salmonella* sp. (1000x). (E), (F), (G) e (H) com adesão de *Salmonella* sp. (10000x).

As leituras médias de OD das células de *Salmonella* sp. aderidas ao PP na comparação do controle com os tratamentos, diferentemente do PU, foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 7). Após o desafio do biofilme formado no PP por 96h as médias de OD dos tratamentos AC e AC+AP foram estatisticamente diferentes do controle positivo ($p>0,05$). Após a reincubação (192h), somente as médias de OD do tratamento AC+AP foram diferentes do controle ($p>0,05$). A densidade dos próprios sanitizantes pode ter interferido nas leituras de OD.

Tabela 7 - Efeito dos tratamentos sobre as densidades ópticas médias do biofilme formado por *Salmonella* em PU e PP com 96h de incubação e seguido de nova incubação por 96h (total 192h) e extraído sob agitação em *vortex*.

Material	Incubação	Densidade Óptica Média (OD)			
		Controle	AC	AP	AC+AP
PU	96h	0,205 ^a	0,152 ^a	0,170 ^a	0,183 ^a
	192h	0,204 ^a	0,251 ^a	0,261 ^a	0,205 ^a
PP	96h	0,215 ^a	0,137 ^b	0,154 ^{ab}	0,146 ^b
	192h	0,317 ^a	0,213 ^{ab}	0,202 ^{ab}	0,186 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Controle: contagens sem desafio com sanitizantes, AC: tratamento com alcalino clorado, AP: tratamento com ácido peracético e AC+AP: tratamento com uma combinação de ambos. PU: Poliuretano e PP: polipropileno.

Embora Tsukatani et al. (2008) tenham encontrado relações lineares entre OD e a contagem de colônias microbianas viáveis em placas, da maneira como foram avaliadas nesse estudo essas leituras sofreram influência de outros fatores como a agitação para a remoção das células aderidas, o sanitizante e o próprio indicador de viabilidade celular. Martín-Espada et al. (2014) mostraram que medição da OD em testes de eficácia de sanitizantes foi capaz de substituir a contagem em placa. No entanto neste estudo a inspeção visual das placas após a adição do marcador de respiração celular XTT e verificação da cor laranja a olho nu refletiram exatamente os tratamentos em que foi possível recuperar células viáveis através de contagens em placa, diferentemente das leituras de OD que não puderam ser completamente relacionadas às contagens.

Para amenizar os fatores que interferiram na OD, foi realizada uma comparação das médias das leituras da OD das três repetições de cada estirpe (fraca, moderada e forte) por tempo de contato com as leituras dos controles

negativos, estes *slides* passaram exatamente pelos mesmos processos, só não receberam inóculo bacteriano (Tabela 8). Esta comparação foi adaptada da leitura dos biofilmes em placas de poliestireno proposta por Stepanović et al. (2000). A Tabela 8 foi confeccionada com intuito de evidenciar a diferença das leituras de OD das células do biofilme formado nos dois materiais em 96h e após reincubação (192h).

Para tanto, na Tabela 8 são mostradas as classificações em “ausente”, “fraca” e “moderada” quanto a diferença das leituras da OD das células do biofilme em relação ao controle negativo. Não houve nenhuma combinação de tempo e tratamento classificada com diferença “forte” em relação ao controle negativo. Nota-se na coluna que representa o total das classificações em 96h e após reincubação (resultado entre parêntesis), que em ambos os materiais após a reincubação aumenta a diferença na leitura da OD em relação ao controle negativo. Observando os tempos em cada tratamento, na maioria, a classificação das três combinações não mostraram alterações ou apresentaram um aumento na classificação da diferença em relação ao controle negativo em 96h e 192h. Este aumento na classificação pode ser decorrente de células que foram capazes de se multiplicar, porém não formaram colônias em TSA, ou seja, células no estado VBNC.

Com exceção do tratamento AC+AP que em ambos os materiais no tempo 10 e 15 e somente no PP no tempo 5, a classificação em relação ao controle negativo reduziu após a reincubação. Esse resultado pode ter relação com as altas leituras do controle negativo com 192h de incubação, que podem ser evidenciadas pela diferença das médias dos controles negativos de todas as repetições (médias das leituras de OD dos controles negativos com 96h de incubação subtraídas das médias com 192h) que no tratamento AC+AP foram estatisticamente maiores que nos demais tratamentos (Tabela 9). A avaliação da OD após a adição do marcador de viabilidade XTT visou investigar as células VBNC. Contudo as leituras dos controles negativos em alguns casos foram idênticas as leituras de poços em que foi possível recuperar UFC em placa, fato que inviabilizou realizar maiores inferências sobre VBNC a partir dos resultados da OD.

Tabela 8 - Classificação das estirpes quanto à diferença de OD em relação ao controle negativo conforme o tratamento e o tempo de contato.

Tratamento/Tempo		AC				AP				AC+AP				Total
Material	Diferença	5	10	15	30	5	10	15	30	5	10	15	30	
PU (36)	Ausente	1(0)	3(3)	2(1)	0(0)	1(0)	2(2)	1(0)	0(0)	1(1)	1(3)	1(2)	0(0)	13(12)
	Fraca	2(3)	0(0)	1(2)	3(1)	2(1)	1(1)	2(3)	2(1)	2(2)	2(0)	2(1)	3(2)	22 (17)
	Moderada	0(0)	0(0)	0(0)	0(2)	0(2)	0(0)	0(0)	1(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(1)	1 (7)
	Ausente	1(0)	1(0)	2(0)	-	2(0)	3(3)	3(3)	-	0(1)	0(3)	0(1)	-	12(11)
PP (27)	Fraca	2(1)	2(3)	1(3)	-	1(3)	0(0)	0(0)	-	2(1)	3(0)	3(2)	-	14(13)
	Moderada	0(2)	0(0)	0(0)	-	0(0)	0(0)	0(0)	-	1(1)	0(0)	0(0)	-	1(3)

AC: tratamento com alcalino clorado, AP: tratamento com ácido peracético e AC+AP: tratamento com uma combinação de ambos. PU: Poliuretano e PP: polipropileno. O número fora de parêntesis representa a classificação em 96h, entre parêntesis 192h.

Tabela 9 - Médias das leituras de OD dos controles negativos conforme o material, tratamento e tempo de incubação.

Densidades ópticas médias dos controles negativos (OD)					
Incubação	Material	AC	AP	AC+AP	Média
96h	PU	0,142	0,131	0,137	0,137 ^{ns}
	PP	0,126	0,215	0,104	0,148 ^{ns}
	Média	0,134 ^{ns}	0,173 ^{ns}	0,120 ^{ns}	
192h	PU	0,158	0,147	0,196	0,167 ^{ns}
	PP	0,127	0,212	0,161	0,167 ^{ns}
	Média	0,142 ^{ns}	0,180 ^{ns}	0,179 ^{ns}	
192h-96h	PU	0,016	0,016	0,059	
	PP	0,001	-0,003	0,057	
	Média	0,008 ^b	0,006 ^b	0,058 ^a	

ns: não significativo

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maioria dos desinfetantes utilizados na concentração recomendada pelo fabricante é eficaz contra *Salmonella* em testes de suspensão. Como, por exemplo, demonstrado por Riazi & Matthews (2011) em *S. Enteritidis* frente a hipoclorito de sódio, gluconato de clorexidina e cloreto de benzalcônio.

Alguns dos principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos são os alcalinos clorados. Nestes agentes de limpeza o cloro atua na remoção de matéria orgânica especialmente proteínas, e também tem propriedades de desinfecção (AARNISALO et al., 2007). Os melhores resultados de inativação de *Salmonella* sp. na forma de biofilme neste estudo foram obtidos com o uso de AC.

O ácido peracético também é amplamente empregado na indústria de alimentos, bastante apreciado devido às baixas concentrações de uso. O

mecanismo de ação sobre os micro-organismo é uma reação complexa que em geral resulta em oxidação simples, di-hidroxilação das ligações duplas, e na formação de radicais livres (WESSELS & INGMER, 2013). O ácido peracético utilizado sobre células planctônicas demonstra bons resultados (COLLA et al., 2012; VIVIAN, 2014). Em *Staphylococcus aureus*, por exemplo, o ácido peracético foi eficaz contra as células planctônicas e contra as aderidas (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014) e ineficiente na remoção completa em PP e aço inoxidável (JERÔNIMO et al., 2012). Neste estudo, após o tratamento com AP na concentração de 0,2% e reincubação foram recuperadas células viáveis o que demonstra que nessa concentração não foi possível a eliminação completa de *Salmonella* sp. no PU. Machado et al. (2010) mesmo testando as estirpes de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em suspensão, sabidamente mais sensíveis do que as sésseis, também observaram tolerância nas concentrações de 0,2 e 0,3%. Marin et al. (2009) também demonstraram que as concentrações de glutaraldeído, formaldeído e peróxido de hidrogênio utilizadas a campo foram insuficientes contra biofilmes formados por *Salmonella*.

Estes resultados apontam para a necessidade de mais estudos a fim de encontrar concentrações de ácido peracético eficazes *in vitro* e *in situ*. Adicionalmente, alertam para a necessidade de revisão metodológica nos testes oficiais de verificação da eficácia dos sanitizantes, para que sejam estendidos também a diferentes espécies bacterianas formadoras de biofilmes.

5.2 Multirresistência a antimicrobianos e produção de ESBL por *Salmonella* sp.

Todas as estirpes testadas (98) demonstraram algum grau de formação de biofilmes. Nos resultados obtidos no teste de suscetibilidade, somente três estirpes apresentaram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados, quatro foram resistentes a uma classe, sete a duas classes e 84 (86%) foram consideradas multirresistentes (resistentes a três ou mais classes). Foram observadas diferenças quanto a sensibilidade conforme a sala de corte, o que pode ter relação com as diversas origens dos frangos abatidos e a exposição à estirpes com perfis de resistência aos antimicrobianos distintos ao longo da criação. Podem ainda estar

relacionadas a variações no manejo e administração de antimicrobianos preconizados pela empresa integradora. As únicas estirpes sensíveis a todos os antimicrobianos testados (3/98) eram originárias da Sala 3, e representaram 16% (3/19) do total de estirpes isoladas a partir de amostras desta sala. Ainda na Sala 3 o mesmo percentual de resistência foi detectado a uma e a duas classes antimicrobianas e 52% (10/19) foram multirresistentes. Contudo, nas Salas 1, 2 e 4 as estirpes de *Salmonella* sp. foram multirresistentes em 100% (26/26), 87% (20/23) e 93% (28/30), respectivamente.

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos já foi utilizado para a biotipagem de *Salmonella* Enteritidis (STUBBS et al., 1994). E em alguns estudos os diferentes perfis de resistência encontrados foram confrontados com os resultados dos agrupamentos gerados pelo *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (XIA et al., 2009; NGOI & THONG, 2013; KEELARA et al., 2014).

Por outro lado, pesquisadores como Malcova et al. (2008) defendem que há correlação entre a formação de biofilmes e a resistência antimicrobiana. Em especial devido à menor taxa de crescimento e maior troca de material genético entre as células do biofilme (GHIGO, 2001). O que pode favorecer a troca de plasmídeos contendo genes de resistência.

Todos os perfis de resistência e a classificação quanto a formação de biofilmes das estirpes multirresistentes conforme a sala de origem, juntamente com o percentual correspondente em cada sala são mostrados na Figura 5. A única estirpe fortemente formadora de biofilmes era originária da Sala 2, mostrou-se negativa para ESBL e demonstrou resistência frente aos aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclina. Nas estirpes positivas para ESBL, o perfil de resistência mais freqüente foi frente às classes dos beta-lactâmicos, quinolonas e tetraciclina (38/44), e nas ESBL negativas foi frente aos aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclina (36/54). Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na resistência a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de alimentos de origem animal, especialmente nos produtos avícolas (ANTUNES et al., 2003; HUR et al., 2011; BACCI et al., 2012; AKBAR et al., 2013).

Sala	Biofilmes			Perfis de resistência*							Nº	%
	Fraca	Moderada	Forte	ESBL	β-LAC	AMI	QUI	SUT	TET	POL		
1	■			■	■	■	■		■		2	8
		■		■	■		■		■		1	4
	■			■	■		■		■		4	15
		■		■	■		■		■		2	8
	■					■	■	■	■		1	4
		■				■	■	■	■		1	4
	■					■	■		■		6	23
		■				■	■		■		8	31
2	■				■		■		■		1	4
	■			■	■		■		■		3	15
		■		■	■		■		■		2	10
	■					■	■		■		4	20
		■				■	■		■		10	50
3			■			■	■		■		1	5
	■			■	■	■	■		■		1	10
	■			■	■		■		■		4	40
		■		■	■		■		■		1	10
	■					■	■		■		3	30
4		■				■	■		■		1	10
	■			■	■	■	■		■	■	1	4
	■			■	■	■	■		■		2	7
	■			■	■		■		■		20	71
		■		■	■		■		■		1	4
	■				■	■	■		■		1	4
	■					■	■		■		3	11

Figura 5 - Distribuição dos perfis de resistência das estirpes de *Salmonella* sp. multirresistentes conforme o resultado de ESBL, produção de biofilmes e sala de corte de origem.

*β-LAC: beta-lactâmicos; AMI: aminoglicosídeos; QUI: quinolonas; SUT: sulfonamida e trimetoprim; TET: tetraciclina e POL: polimixinas. Nº de cepas e % dentro de cada sala de corte.

Os resultados percentuais do teste de suscetibilidade de *Salmonella* sp. aos antimicrobianos testados estão na Figura 6. Nesse estudo, 100% das estirpes foram sensíveis a ciprofloxacina e 95% foram resistentes ao ácido nalidíxico. Ling et al. (2003) e Hamidiam et al. (2011) sugerem que uma baixa resistência *in vitro* à ciprofloxacina decorre de uma mutação no gene *gyrA*, e que a resistência *in vitro* ao ácido nalidíxico pode ser usada para detectar o real índice de resistência à ciprofloxacina. As fluoroquinolonas são os únicos antimicrobianos que agem diretamente no DNA bacteriano, especificamente nas enzimas topoisomerase IV e DNA girase (BLONDEAU, 2004). A resistência à essa classe deve ser reportada em conjunto, como preconiza o CLSI (2013), em que a resistência a um fármaco implica

na resistência à toda a classe. Deve-se atentar a isso pois na medicina humana as fluoroquinolonas são consideradas os antibióticos de eleição quando preconizado o tratamento contra *Salmonella* spp. (BERTRAND et al., 2006; POKHAREL et al., 2006).

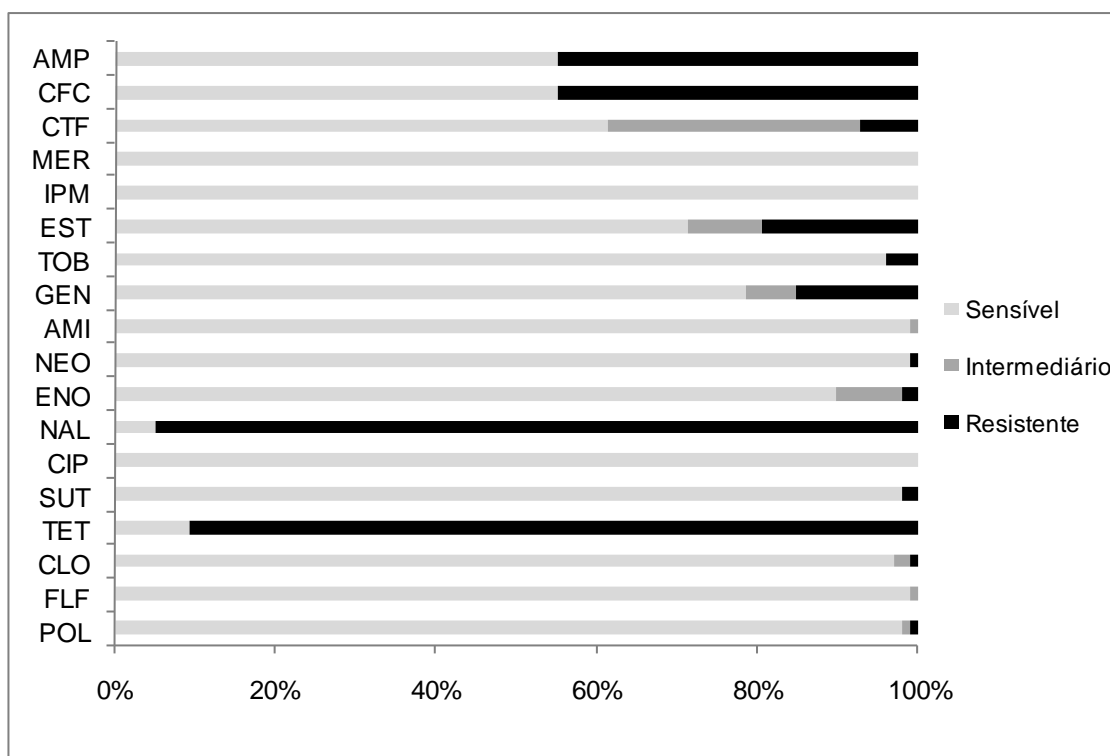


Figura 6 - Resultados percentuais do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar realizado em *Salmonella* sp. isoladas de salas de corte em plantas processadoras de aves. Em que: ampicilina (AMP), cefaclor (CFC), ceftiofur (CTF), meropenem (MER), imipenem (IPM), estreptomicina (EST), tobramicina (TOB), gentamicina (GEN), amicacina (AMI), neomicina (NEO), enrofloxacina (ENO), ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), sulfatrimetoprim (SUT), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLF) e polimixina B (POL).

Índices de resistência elevados também foram vistos frente à tetraciclina (91%), sendo que este antimicrobiano foi amplamente utilizado de maneira profilática em rações de frangos de corte até sua proibição no Brasil (BRASIL 1992). A resistência de *Salmonella* spp. isoladas na cadeia produtiva de frangos tem se mostrado variável em todo o mundo, com percentuais entre 96,6% e 21,8% (MANIE et al., 1998; CARRAMIÑANA et al., 2004; THAI et al., 2012). No Brasil, Oliveira et al. (2005) consideraram baixos (15,4%) os índices de resistência encontrados em *Salmonella* Enteritidis isoladas a partir de humanos, carcaças de frangos, outras amostras relacionadas a aves e alimentos envolvidos em surtos alimentares na região sul. Os elevados índices de resistência observados podem estar relacionados

a difusão dos diversos genes *tet* que conferem resistência de *Salmonella* a tetraciclinas (PEZZELLA et al., 2004).

A resistência frente aos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina foi de 19% e 15%, respectivamente. Embora algumas estirpes sejam suscetíveis *in vitro*, essa classe antimicrobiana tende a não ser escolhida para o tratamento de *Salmonella* spp. pois existem alternativas mais eficientes (ZEMBOWER et al., 1998).

Adicionalmente, 97% das estirpes foram sensíveis ao cloranfenicol, um dos primeiros fármacos utilizados na veterinária, de uso proibido em animais de produção no Brasil desde 1998 (BRASIL, 1998). Martins et al. (2000) isolaram *Salmonella* spp. de miúdos de aves e observaram 54,5% das amostras resistentes ao cloranfenicol, índices superiores aos observados neste estudo. Sugere-se que esse resultado esteja correlacionado com a proibição do uso desse antimicrobiano em aves.

Outros resultados apresentados por Martins et al. (2000) mostram que 45% das estirpes foram resistentes à ampicilina e embora tenham se passado quase 15 anos entre as pesquisas, o mesmo percentual foi encontrado neste estudo para os beta-lactâmicos ampicilina e cefaclor. A resistência de *Salmonella* spp. frente à ampicilina também foi relatada por outros autores (BACCI et al., 2012; CLEMENTE et al., 2014; EGERVÄRN et al., 2014). Já em relação ao ceftiofur, uma cefalosporina de 3ª geração, foi observada a maior ocorrência de estirpes com suscetibilidade intermediária que somadas às resistentes representaram 39%. As cefalosporinas de 3ª geração, juntamente com os penicilínicos, carbapenêmicos e quinolonas são os antimicrobianos considerados criticamente importantes para o tratamento de *Salmonella* pela OMS (WHO, 2012).

Todas as estirpes foram sensíveis aos carbapenêmicos testados, esse resultado é importante, uma vez que os carbapenêmicos são os antimicrobianos de primeira escolha para os micro-organismos produtores de ESBL (ZHANEL et al. 2007).

Em 45% (44/98) das estirpes foi observada produção de ESBL, que também foram multirresistentes e resistentes ao ácido nalidíxico. Na Figura 7 observa-se uma das estirpes produtoras de ESBL pelo método de disco-difusão dupla utilizado neste estudo. A diferença da porcentagem de estirpes ESBL positivas conforme a sala de corte de origem foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). O risco relativo e a razão de chance de isolamento de uma estirpe positiva foram

maiores na sala 4, da qual 54% (24/44) das estirpes positivas eram originárias. Clemente et al. (2013) em avaliação de 1120 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos de origem animal por uma metodologia diferente da utilizada neste estudo, encontraram somente cinco produtoras de ESBL. Nogueira-Miranda et al. (2012) compararam seis metodologias para detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. e concluíram que a de disco-difusão dupla apresentou sensibilidade de 89,2% e especificidade de 100% para esta espécie. A ausência de uma metodologia padrão aprovada por comitês internacionais para avaliar fenotipicamente a produção de ESBL por *Salmonella* spp. pode estar subestimando a sua ocorrência e dificulta a comparação das pesquisas.

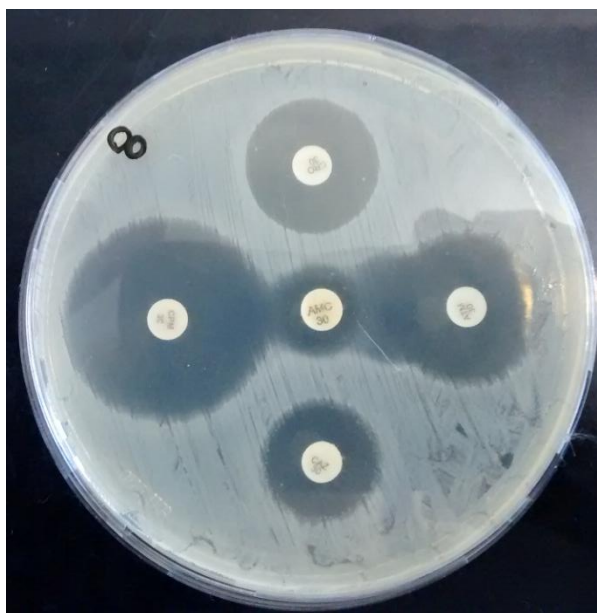


Figura 7 - Estirpe ESBL positiva, observa-se que a zona de inibição em torno do aztreonam (ATM) aumentou na direção do disco central com amoxilina com ácido clavulânico (AMX/AC) e os halos em torno das cefalosporinas inferiores a 19 mm.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

Todas as estirpes de *Salmonella* sp. avaliadas aderiram ao poliestireno sendo a maioria classificada como fracamente formadora de biofilmes.

Todas as estirpes foram positivas para a presença dos genes *csgD* e *adrA*.

Foram observadas diferenças na adesão de *Salmonella* sp. no material comumente utilizado para avaliar a habilidade de formação de biofilmes *in vitro* e nos materiais utilizados nas superfícies das esteiras nas plantas processadoras de aves, de onde as estirpes foram isoladas.

Todos os sanitizantes industriais nas concentrações testadas sobre o biofilme formado por 96h mostraram-se eficazes. Após a reincubação as contagens residuais do biofilme formado no poliuretano tratado com ácido peracético mostraram uma redução inferior à desejada para considerar um sanitizante eficaz. No polipropileno a remoção foi mais efetiva, devido à maior lisura deste material observada na microscopia eletrônica de varredura, enquanto que o poliuretano mostrou-se mais rugoso.

Nas condições avaliadas neste estudo, os resultados obtidos pelas leituras de OD não concordaram com os resultados das contagens em placa.

Em relação os testes de suscetibilidade a antimicrobianos, foi observada multirresistência em 86% e produção de ESBL por 45% das estirpes avaliadas.

Os resultados obtidos neste estudo atentam para a importância do isolamento de cepas com capacidade de formar biofilmes em superfícies de maquinários e utensílios em matadouros-frigoríficos de aves, fato que pode incorrer em uma maior permanência desses micro-organismos na indústria e na sua consequente transferência para os alimentos.

Adicionalmente, estes resultados devem ser utilizados como alerta para a implantação de programas de autocontrole efetivos, que assegurem o uso da concentração adequada e que os sanitizantes atinjam uniformemente todas as superfícies a serem higienizadas. De modo a evitar a transferência de micro-organismos potencialmente patogênicos e por vezes multirresistentes aos antimicrobianos para os alimentos e consequentemente aos consumidores.

7 BIBLIOGRAFIA

AARNISALO, K.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H.; WIRTANEN, G. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 1041–1048, 2007.

- ABDALLAH, F. BEN; LAGHA, R.; SAID, K.; KALLEL, H.; GHARBI, J. Detection of Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm and Fimbriae Genes in *Salmonella* Isolated from Tunisian Clinical and Poultry Meat. **Iranian J Publ Health**, v. 43, n. 4, p. 423–431, 2014.
- AKBAR, A.; ANAL, A. K.; ANSARI, F. A. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 163–8, 2013.
- ALMEIDA, M. V.; SILVA, A.; NERO, L. A. Evaluation of target sequences for the polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in artificially contaminated beef. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 2, p. 111–8, 2014.
- ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–1824, 2000.
- ANDREWS, W., HAMMACK, T. *Salmonella*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. [s.l.] U.S. Food and Drug Administration. 2007.
- ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.; NAZARE PESTANA. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 97–103, 2003.
- ASSÉRÉ, A; OULAHAL, N.; CARPENTIER, B. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1692–702, 2008.
- BACCI, C.; BONI, E.; ALPIGIANI, I.; et al. International Journal of Food Microbiology Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 16–23, 2012.
- BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J. A. J.; RICH, C.; FORESTIER, C. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, 2005.
- BELVAL, S. C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; et al. Assessment of the Roles of LuxS , S -Ribosyl Homocysteine , and Autoinducer 2 in Cell Attachment during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006.
- BERCHIERI, A; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C. K.; BARROW, P. A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 30, n. 4, p. 297–310, 2001.

- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, n. 05, p. 127–52, 2005.
- BERTRAND, S.; WEILL, F.-X.; CLOECKAERT, A.; et al. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2897–903, 2006.
- BETTIO, G. D. S. **Estudo da aderência e formação de biofilme de *Candida* spp. em cateter urinário confeccionado em látex siliconizado e silicone total**, 2010. Universidade de São Paulo.
- BHOWMICK, P. P.; DEVEGOWDA, D.; RUWANDEEPIKA, H. A D.; et al. gcpA (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. **Microbial pathogenesis**, v. 50, n. 2, p. 114–22, 2011.
- BLANC, V.; MESA, R.; SACO, M.; et al. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. **Veterinary microbiology**, v. 118, n. 3-4, p. 299–304, 2006.
- BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of ophthalmology**, v. 49 Suppl 2, n. March, p. S73–8, 2004.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; MAXIMILIANO, V.; et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2008, n. 003244, p. 886–895, 2009.
- BONNET, R.; DUTOIR, C.; SAMPAIO, J. L. M.; et al. Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with Increased Catalytic Efficiency Due to Substitution Asp-240->Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2269–2275, 2001.
- BOYEN, F.; EECKHAUT, V.; IMMERSEEL, F. VAN; et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 187–195, 2009.
- BRASIL. 1993. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos determinando seu emprego em todas as atividades desenvolvidas pela rede oficial do sistema coordenado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal CGLA do Departamento de Defesa Animal - DDA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília.
- BRASIL 1998. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares que especifica e revoga a portaria que menciona. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.

- BRASIL 1992. Portaria nº 159, de 23 de junho de 1992. Dispõe sobre a proibição do uso de clortetraciclina, oxitetraciclina e penicilina como promotores de crescimento. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.
- BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 640–646, 2000.
- BRUINSMA, G. M.; MEI, H. C. VAN DER; BUSSCHER, H. J. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. **Biomaterials**, v. 22, n. 24, p. 3217–24, 2001.
- BURMØLLE, M.; WEBB, J. S.; RAO, D.; et al. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3916–3923, 2006.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***, 2004. Universidade do Minho.
- CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 104, p. 133–139, 2004.
- CASALINI, J. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos**, 2008. Universidade Federal de Pelotas.
- CERCA, N.; MARTINS, S.; CERCA, F.; et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 331–6, 2005.
- CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 3, p. 247–54, 2010.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature protocols**, v. 3, n. 12, p. 1909–24, 2008.
- CHIA, T. W. R.; GOULTER, R. M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853–9, 2009.
- CLEMENTE, L.; CORREIA, I.; THEMUDO, P.; et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* isolates from healthy breeder and broiler flocks in Portugal. **The Veterinary journal**, v. 200, n. 2, p. 276–81, 2014.
- CLEMENTE, L.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; et al. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 2, p. 221–8, 2013.

- CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 23rd Informational Supplement. **CLSI document M100-S23**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard. 3rd ed. **CLSI document M31-A3**. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L.; et al. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 289–292, 2012.
- CORCORAN, M. **Salmonella enterica - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces**. 2013. National University of Ireland Galway.
- CRÉMET, L.; CAROFF, N.; DAUVERGNE, S.; et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. **Pathologie-biologie**, v. 59, n. 3, p. 151–6, 2011.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES: biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.
- DANTAS, S. T. A.; VIVIAN, R. C.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; BAPTISTÃO, L. G.; ZANUTTO, M. R.; RALL, V. I. M. Pesquisa dos genes *csgD* e *adrA* envolvidos na produção de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis. **Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.
- DIERIKX, C.; ESSEN-ZANDBERGEN, A. VAN; VELDMAN, K.; SMITH, H.; MEVIUS, D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 273–8, 2010.
- DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 173–80, 2012.
- DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T. G. The importance of *RpoS* in the survival of bacteria through food processing. **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 3, p. 189–94, 2002.
- DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. **International journal of food microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 46–50, 2007.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, 2002.
- EGERVÄRN, M.; BÖRJESSON, S.; BYFORS, S.; et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and

- Salmonella* on meat imported into Sweden. **International journal of food microbiology**, v. 171, p. 8–14, 2014.
- EUCAST 2013. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden.
- FAO. Food Quality and Safety Systems. **A training manual on food hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point System**. Rome: FAO, 1998.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291–296, 2005.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.
- GALVÃO, N. N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M. T.; AGUIAR FERREIRA, M. DE; NERO, L. A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat science**, v. 92, n. 4, p. 635–43, 2012.
- GARRIDO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALÓN, I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. **Food Control**, v. 20, n. 11, p. 986–991, 2009.
- GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. **Research in microbiology**, v. 154, n. 10, p. 659–67, 2003.
- GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 442–5, 2001.
- GIBSON, D. L.; WHITE, A. P.; SNYDER, S. D.; et al. *Salmonella* Produces an O-Antigen Capsule Regulated by *AgfD* and Important for Environmental Persistence. **Journal of Bacteriology**, 2006.
- GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 98–110, 2002.
- GRANTCHAROVA, N.; PETERS, V.; MONTEIRO, C.; ZAKIKHANY, K.; RÖMLING, U. Bistable expression of *CsgD* in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 456–66, 2010.
- GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International journal of food microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77–87, 2009.

- GUALDI, L.; TAGLIABUE, L.; BERTAGNOLI, S.; et al. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. **Microbiology**, p. 2017–2024, 2008.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26–9, 2010.
- HABIMANA, O.; HEIR, E.; LANGSRUD, S.; ASLI, A. W.; MØRETRØ, T. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4557–9, 2010.
- HAMIDIAN, M.; TAJBAKHSH, M.; TOHIDPOUR, A.; et al. Detection of novel gyrA mutations in nalidixic acid-resistant isolates of *Salmonella enterica* from patients with diarrhoea. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 4, p. 360–4, 2011.
- HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F. M. beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–21, 2005.
- HERMANS, K.; NGUYEN, T. L. A.; ROBERFROID, S.; et al. Gene expression analysis of monospecies *Salmonella typhimurium* biofilms using differential fluorescence induction. **Journal of microbiological methods**, v. 84, n. 3, p. 467–78, 2011.
- HONRAET, K.; GOETGHEBEUR, E.; NELIS, H. J. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. **Journal of microbiological methods**, v. 63, n. 3, p. 287–95, 2005.
- HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424–434, 2010.
- HOUDT, R. VAN; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–31, 2010.
- HUR, J.; KIM, J. H.; PARK, J. H.; LEE, Y.-J.; LEE, J. H. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. **Veterinary journal (London, England)**: 1997, v. 189, n. 3, p. 306–11, 2011.
- HURRELL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M.; CAUBILLA-BARRON, J.; FORSYTHE, S. J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 2, p. 227–31, 2009.
- HYDE, F. W.; ALBERG, M.; SMITH, K. Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and

- removal. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 142–9, 1997.
- JERÔNIMO, H. M. Â.; QUEIROGA, R. DE C. R. DO E.; COSTA, A. C. V. DA; et al. Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food processing plants as affected by growth medium , surface type and incubation temperature. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, 2012.
- JIANG, H.-X.; SONG, L.; LIU, J.; et al. Multiple transmissible genes encoding fluoroquinolone and third-generation cephalosporin resistance co-located in non-typhoidal *Salmonella* isolated from food-producing animals in China. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 3, p. 242–7, 2014.
- JONG, A. DE; SMET, A.; LUDWIG, C.; et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011). **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 3-4, p. 298–306, 2014.
- JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–72, 2001.
- KEELARA, S.; SCOTT, H. M.; MORROW, W. M.; et al. Comparative phenotypic and genotypic characterization of temporally related nontyphoidal *Salmonella* isolated from human clinical cases, pigs, and the environment in North Carolina. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 2, p. 156–64, 2014.
- KIM, S.-H.; WEI, C.-I. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 on food contact surfaces. **Journal of food protection**, v. 72, n. 9, p. 1841–7, 2009.
- KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 506–508, 2003.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9–27, 1998.
- LAGHA, R.; ABDALLAH, F. BEN; BAKHROUF, A. Influence of the *rpoS* gene and pre-adaptation in seawater on the tolerance to heavy metals of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1517–1522, 2012 a.
- LAGHA, R.; ABDALLAH, F. BEN; ELLAFI, A.; BÉKIR, K.; BAKHROUF, A. Biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and fatty acids analysis of starved *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in seawater. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 9, p. 786–91, 2012 b.
- LAITMAN, I.; NATAN, M.; BANIN, E.; MARGEL, S. Synthesis and characterization of fluoro-modified polypropylene films for inhibition of biofilm formation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 8–14, 2014.

- LANSINI, V. **Eficiência do TIMSEN® nas etapas de escaldagem e pré-resfriamento em abatedouro de aves.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2010.
- LEJEUNE, P. Biofilms. In: M. Wilson; D. Devine (Eds.); **University of Cambridge**, 2003. Cambridge.
- LI, R.; KUDA, T.; YANO, T. Effect of food residues on efficiency of surfactant disinfectants against food related pathogens adhered on polystyrene and ceramic surfaces. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 200–206, 2014.
- LI, X.-Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary microbiology**, v. 121, n. 3-4, p. 197–214, 2007.
- LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–8, 2012.
- LING, J. M.; CHAN, E. W.; LAM, A. W.; CHENG, A. F. Mutations in Topoisomerase Genes of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonellae* in Hong Kong. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3567–3573, 2003.
- LIU, X.; NG, C.; FERENCI, T. Global Adaptations Resulting from High Population Densities in *Escherichia coli* Cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 15, 2000.
- LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum b-lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 3–10, 2008.
- MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. DA S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.
- MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.
- MAIRA-LITRAN, T.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (mar) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 243–247, 2000.
- MALCOVA, M.; HRADECKA, H.; KARPISKOVA, R.; RYCHLIK, I. Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. **Veterinary microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 360–6, 2008.
- MANGALAPPALLI-ILLATHU, A. K.; VIDOVIĆ, S.; KORBER, D. R. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3669–80, 2008.

- MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V. S.; VEITH, W. J.; GOUWS, P. A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. **Letters in Applied Microbiology**, p. 253–258, 1998.
- MARIN, C.; HERNANDIZ, A; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry science**, v. 88, n. 2, p. 424–31, 2009.
- MARTÍN-ESPADA, M. C.; D'ORS, A.; BARTOLOMÉ, M. C.; PEREIRA, M.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 58–61, 2014.
- MARTINS, S.C.S., SERIO, J., MATTEI, A.C.M. & ALBUQUERQUE, L.M.B. *Salmonella* em miúdos de aves: resistência a antibióticos. **Higiene Alimentar**. 14:74-76. 2000.
- MIRIAGOU, V.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; TZOUVELEKIS, L. S. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 6, p. 547–55, 2004.
- MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73–87, 2009.
- MØRETRØ, T.; HEIR, E.; NESSE, L. L.; VESTBY, L. K.; LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532–544, 2012.
- MØRETRØ, T.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1005–12, 2009.
- NGOI, S. T.; THONG, K. L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 77, n. 4, p. 304–11, 2013.
- NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 383–388, 2014.
- NGUYEN, H. D. N.; YUK, H.-G. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 236–240, 2013.
- NOGUEIRA, K. D. S.; PAGANINI, M. C.; CONTE, A.; et al. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 32, n. 2, p. 87–92, 2014.

- NOGUEIRA-MIRANDA, K. D. S.; PALMEIRO, J. K.; CONTE, D.; et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* spp. evaluation of six phenotypic tests. **Microbial drug resistance**, v. 18, n. 1, p. 66–70, 2012.
- O'LEARY, D.; CABE, E. M. M.; MCCUSKER, M. P.; et al. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 1, p. 36–43, 2013.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.
- OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A. I.; et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. **Meat science**, v. 93, n. 2, p. 316–21, 2013.
- OLIVEIRA, D. C. V. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp . isolada de frango**, 2011. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho.”
- OLIVEIRA, D. C. V. DE; JUNIOR, A. F.; KANENO, R.; et al. Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne pathogens and disease**, p. 1–7, 2014.
- OLIVEIRA, M. C. DE. **Enterobacteriaceae resistentes às cefalosporinas de terceira geração isoladas em amostras obtidas nas primeiras 48 horas de internação em um hospital universitário: frequência, fatores de risco e impactos na evolução clínica**, 2013. Universidade Federal de Minas Gerais.
- OLIVEIRA, M. M. M. DE; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.
- OLIVEIRA, S. D. DE; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R. DOS; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses , food , human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 297–305, 2005.
- OLIVER, J. D. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. February, p. 93–100, 2005.
- PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International journal of food microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 41–7, 2010.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of microbiological methods**, v. 72, n. 2, p. 157–65, 2008.
- PENEAU, S.; CHASSAING, D.; CARPENTIER, B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2839–46, 2007.

- PEREZ, K. J. **Sobrevivência em fluido gástrico simulado e capacidade de invasão intestinal de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium induzidas e não induzidas à adaptação ácida**, 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PEZZELLA, C.; RICCI, A.; DIGIANNATALE, E.; LUZZI, I.; CARATTOLI, A. Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes , Transposons , and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 903–908, 2004.
- PITOUT, J. D. D.; REISBIG, M. D.; VENTER, E. C.; CHURCH, D. L.; HANSON, N. D. Modification of the Double-Disk Test for Detection of Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum and AmpC-Lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3933–3935, 2003.
- PIVA, E.; BARBOSA, J. DE O.; ROSSONI, R. D.; et al. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 40, n. 5, p. 222–227, 2011.
- POKHAREL, B. M.; KOIRALA, J.; DAHAL, R. K.; et al. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 434–8, 2006.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in microbiology**, v. 154, n. 3, p. 173–4, 2003.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in microbiology**, v. 155, n. 7, p. 568–70, 2004.
- PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms□: A survival strategy of bacteria. **Current Science**, v. 85, n. 9, 2003.
- PUFFAL, J. **Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella* Enteritidis**. (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013.
- QUEIROZ, M. L. P.; ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 1, p. 91–4, 2012.
- RANDALL, L. P.; COOLES, S. W.; COLDHAM, N. G.; et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising

- virulence. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1273–80, 2007.
- RANDALL, L. P.; COOLES, S. W.; PIDDOCK, L. J. V; WOODWARD, M. J. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 621–7, 2004.
- REŚLIŃSKI, A; DĄBROWIECKI, S.; GŁOWACKA, K. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. **Hernia**: the journal of hernias and abdominal wall surgery, 2013.
- RIAZI, S.; MATTHEWS, K. R. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 374–378, 2011.
- RODRIGUES, L. B.; RUSCHEL, L.; RIZZO, N. N.; et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. December 2008, p. 225–230, 2009.
- ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of immunological methods**, v. 142, n. 2, p. 257–65, 1991.
- RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in microbiology**, v. 153, n. 4, p. 205–12, 2002.
- RÖMLING, U.; BIAN, Z.; HAMMAR, M.; SIERRALTA, W. D.; NORMARK, S. Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 180, n. 3, p. 722–731, 1998.
- RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; et al. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International journal of medical microbiology**: IJMM, v. 293, n. 4, p. 273–85, 2003.
- RÖMLING, U.; ROHDE, M.; OLSÉN, A; NORMARK, S.; REINKÖSTER, J. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 1, p. 10–23, 2000.
- RÖMLING, U.; SIERRALTA, W. D.; ERIKSSON, K.; NORMARK, S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 2, p. 249–64, 1998.
- RYU, S.-H.; LEE, J.-H.; PARK, S.-H.; et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **International journal of food microbiology**, v. 159, n. 3, p. 263–6, 2012.

- SALO, S.; EHAVALD, H.; RAASKA, L.; VOKK, R.; WIRTANEN, G. Microbial surveys in Estonian dairies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 460–471, 2006.
- SANDBERG, M. E.; SCHELLMANN, D.; BRUNHOFER, G.; et al. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. **Journal of microbiological methods**, v. 78, n. 1, p. 104–6, 2009.
- SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome biology**, v. 4, n. 6, p. 219, 2003.
- SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food microbiology**, v. 35, n. 1, p. 65–72, 2013.
- SHARMA, M.; ANAND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, v. 19, p. 627–636, 2002.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, p. 407–413, 2009.
- SILAGYI, K.; KIM, S.-H.; LO, Y. M.; WEI, C. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. **Food microbiology**, v. 26, n. 5, p. 514–9, 2009.
- SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793–808, 2002.
- SOULI, M.; GALANI, I.; ANTONIADOU, A.; et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase Klebsiella pneumoniae Carbapenemase 2-producing K. pneumoniae in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 364–73, 2010.
- SOUSA JUNIOR, M. A. DE; FERREIRA, E. DOS S.; CONCEIÇÃO, G. C. DA. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, p. 152–174, 2004.
- SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.
- STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. DE. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012.
- STEPANOVIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RANIN, L.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–32, 2004.

- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–9, 2000.
- STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International journal of medical microbiology** □: **IJMM**, v. 292, n. 2, p. 107–13, 2002.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.
- STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.
- STOODLEY, P.; SIDHU, S.; NISTICO, L.; et al. Kinetics and morphology of polymicrobial biofilm formation on polypropylene mesh. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 65, n. 2, p. 283–90, 2012.
- STUART, J. C.; MUNCKHOF, T. VAN DEN; VOETS, G.; et al. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 212–4, 2012.
- STUBBS, A. D.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; FARMER, J. J. Differentiation of *Salmonella enteritidis* Phage Type 8 Strains □: Evaluation of Three Additional Phage Typing Systems , Plasmid Profiles , Antibiotic Susceptibility Patterns , and Biotyping. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 1, p. 199–201, 1994.
- TELLIER, R.; KRAJDEN, M.; GRIGORIEW, G. A; CAMPBELL, I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1619–25, 1992.
- THAI, T. H.; HIRAI, T.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 2, p. 147–51, 2012.
- THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 141–8, 2002.
- TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. Pt 1, p. 521–4, 2005.
- TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* in Biofilms Isolated from Chicken Houses. , v. 65, n. 7, p. 1110–1116, 2002.
- TSUKATANI, T.; SUENAGA, H.; HIGUCHI, T.; et al. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. **Journal of microbiological methods**, v. 75, n. 1, p. 109–16, 2008.

- UBABEF. Relatório Anual 2014. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso em agosto de 2014.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8–16, 2014.
- VESTBY, L. K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC veterinary research**, v. 5, p. 20, 2009.
- VIANA, C. **Uso de aspersão de água sobre a contaminação superficial de esteiras sanitárias condutoras de cortes de frango em frigoríficos de aves**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Palotina. 2014.
- VIVIAN, R. C. **Avaliação da formação de biofilmes e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Campus Botucatu. São Paulo. 2014.
- WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Raw Whole Milk in Farm Bulk Tanks and in Dairy Plant Receiving Tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3366–3370, 2002.
- WANG, H.; YE, K.; WEI, X.; et al. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 378–384, 2013.
- WASYL, D.; HOSZOWSKI, A. First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 958–961, 2012.
- WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: a review. **Regulatory toxicology and pharmacology**: RTP, v. 67, n. 3, p. 456–67, 2013.
- WHO 2012. **Critically important antimicrobials for human medicine – 3rd rev.** World Health Organization 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Acesso novembro de 2014.
- XIA, X.; ZHAO, S.; SMITH, A.; et al. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International journal of food microbiology**, v. 129, n. 1, p. 93–8, 2009.

- YOON, Y.; SOFOS, J. N. Autoinducer-2 activity of gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. **Journal of food science**, v. 73, n. 3, p. M140–7, 2008.
- ZEMBOWER, T. R.; NOSKIN, G. A; POSTELNICK, M. J.; NGUYEN, C.; PETERSON, L. R. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 10, n. 2, p. 95–105, 1998.
- ZHANEL G. G., WIEBE R., DILAY L., THOMSON K., RUBINSTEIN E., HOBAN D. J., NOREDDIN A. M. & KARLOWSKY J.A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**. v. 67, p. 1027-52, 2007.
- ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452–63, 2001.

8 APÊNDICES

A - Ficha técnica e de segurança do sanitizante alcalino clorado

Espuma detergente desinfetante	
<i>Sanifoam[®]</i>	
Fabricante	AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA S/A RUA Tavares de Lyra, 3728 – São José dos Pinhais – PR Fone 41 3888 5200 Fax 41 3888 5218 Email aeb@aeb-brasil.com.br
Emprego	Espuma detergente desinfetante cloroativo de média alcalinidade.
Doses de emprego	De 2,0 a 10,0% diluído em água, com o uso de lava jatos ou aplicadores de espuma. Tempo mínimo de contato de 10 minutos.
Embalagem	Bombonas de 5,0 kg, 16,0 kg, 30,0 kg, 250,0 kg e 1.200,0 kg.
<p>Produto não corrosivo em relação ao aço inox em solução alcalina a pH superior a 8, a borracha, ao plástico, ao epóxi e ao cimento. Corrosivo ao alumínio, usar com prudência, fazer teste prévio sobre aço zincado ou estanhado e resina fenólica, utilizar com Combifoam ou Foamlance (Max. 40° C).</p>	
FICHA TÉCNICA E DE SEGURANÇA	
2	COMPOSIÇÃO e INFORMAÇÕES SOBRE INGREDIENTES Hipoclorito de Sódio – CAS 7681-52-9 – Corrosivo. Concentração entre 5 a 10% em cloro livre. Hidróxido de Sódio – CAS 1310-73-2. Corrosivo. Concentração superior a 5% Óxido de cocodimetilamida . Irritante. Concentração entre 1 e 5%
3	IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS Perigo. Veneno. O produto causa graves queimaduras a pele e aos olhos. Produto corrosivo. Perigoso para o homem e para o ambiente. A periculosidade é devida principalmente às propriedades corrosivas do Hidróxido de Sódio (soda cáustica).
4	MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS Não dê nada via oral a uma pessoa inconsciente. Em caso de ingestão acidental não provoque vômito e procure um serviço de saúde ou centro de intoxicação levando esta ficha de segurança, ou a embalagem do produto ou o rótulo do produto. Em caso de aspiração ou inalação, remova a pessoa para um local arejado e se houver sinais de intoxicação, chame socorro médico. Em caso de contato com a pele ou os olhos, lave com água corrente em abundância e se houver sinais de irritação procure um médico com a presente ficha de segurança ou a embalagem do produto ou o rótulo do produto..
5	MEDIDAS ANTI INCÊNDIO Se o preparado estiver envolvido num incêndio, pode liberar gases tóxicos. Afastar o pessoal presente e aproximar-se somente em caso de absoluta necessidade e munido de máscara auto-respiratória. Extinguir o incêndio com água, salvo outras indicações. Consultar as fichas dos outros produtos do depósito. Manter resfriadas as embalagens através de irroração (pulverização) com água e fazer com que o fogo não seja mais alimentado.
6	MEDIDAS EM CASO DE VAZAMENTO ACIDENTAL Bloquear o derramamento, recuperar o produto e evitar que atinja centros de captação de água. Se o produto alcançar centro de captação de água, avisar as autoridades competentes. Nunca neutralizar com produto ácido enquanto estiver desprendendo-se os vapores tóxicos de cloro gasoso.
7	MANUSEIO E ESTOCAGEM Manusear com óculos de segurança com proteção completa dos olhos. Utilizar luvas de borracha ou PVC. Manter o produto afastado de fontes de calor e não expô-lo aos raios solares. A validade é de 12 meses se conservado em condições normais de estocagem em sua embalagem original fechada. Manter fora do alcance de crianças e dos animais domésticos.
8	VALORES LIMITES DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL Hipoclorito de sódio IDLH 10mg/m3. Hidróxido de sódio TLVC 2 mg/m3 . Proteção das mãos: manusear com luvas em borracha ou PVC. Proteção dos olhos: utilizar óculos de segurança com proteção completa dos olhos. Proteção da pele: utilizar avental de borracha ou plástico com botas anti-deslizantes. As calças do macacão devem ser mantidas fora das botas.

9 PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Aspecto físico: Líquido límpido amarelado
 Odor: Característico
 pH puro: De 13,0 a 14,0
 pH a 1%: De 12,0 a 13,0
 Densidade: De 1,2 a 1,3 g/mL
 Solubilidade: Miscível em água em qualquer proporção

10 ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estável as temperaturas normais de estocagem.

11 INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Hipoclorito de sódio: DL50 oral/ ratos maior de 5000 mg/kg; LD50 cutânea/ ratos maior 3000 mg/kg
 Hidróxido de sódio: Efeito tóxico devido as propriedades corrosivas.
 Óxido de cocodimetilamida : LD50 oral/ ratos 2000/ 5000 mg/kg

12 INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Hipoclorito de sódio: LC50 peixes 96 horas : 10 mg/L
 Hidróxido de sódio: LC50 peixes 96 horas : 72 mg/L.. Nocivo para os organismos aquáticos por causa do pH alcalino. É rapidamente neutralizado ao pH do ambiente.
 O produto não contribui para o COD. Contém tensoativos biodegradáveis. Isento de fósforo.

13 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESCARTE

O produto a ser descartado deve ser considerado como um refugo especial e como tal deve ser lançado em equipamentos adequados de depuração, levando em conta, que a parte cloro-ativa se decompõe facilmente e a parte alcalina neutraliza-se com produtos ácidos.
 Não dispondo de equipamentos adequados de depuração dirigir-se a empresas especializadas apresentando a presente ficha. O descarte do refugo, feito por empresas especializadas, deve ser registrado e comunicado às autoridades competentes.
 As embalagens são em polietileno de alta densidade e podem ser recicladas como matérias-primas secundárias, por empresas especializadas e autorizadas.

14 INFORMAÇÕES PARA TRANSPORTE

Número de risco : 80
 Número da ONU : 3266
 Classe de risco : 8
 Descrição da classe: Corrosivo



Veneno



Corrosivo

15 INFORMAÇÕES SOBRE A REGULAMENTAÇÃO

Produto registrado na ANVISA/MS
 Produto autorizado pelo DIPOA/MA

Natureza dos riscos: Em contato com a pele ou os olhos causa graves queimaduras
 Em contato com ácidos libera gases tóxicos

Cuidados preventivos: **Conservar fora do alcance de crianças e de animais domésticos**
 Evitar o contato com os olhos
 Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com água corrente em abundância e consultar um médico.
 Despir imediatamente as vestes contaminadas.
 Usar luvas de borracha ou PVC e proteger os olhos e a face.

16 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

É aconselhável que o responsável pelo uso esteja informado dos riscos específicos que dizem respeito ao uso do produto. O produto não está sujeito a restrições em base a lei que diz respeito aos controles sanitários.
 A presente ficha foi redigida no departamento técnico da AEB spa-Itália, baseados no melhor em sua posse para segurança e consideração a data da última revisão.
 As informações aqui contidas se referem somente as preparações indicadas e podem não valer se o produto for usado em combinação com outras ou em transformações.
 Nada aqui contido deve ser interpretado como garantia, seja explícita ou implícita.
 Em cada caso é responsabilidade do usuário em determinar como essas informações devem ser aplicadas e como determinar a adaptabilidade de cada produto ao seu particular objetivo.



AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA S/A
 Tavares de Lyra, 3728 - Bairro Afonso Pena-São José dos Pinhais-PR
 Fone (041)3888-5200 Fax(041)3888-5218- SAC AEB 0800 722 5217 E-mail: aeb@aeb-brasil.com.br

Data da última revisão: 11.07.12

B - Ficha técnica e de segurança do sanitizante ácido peracético

Desinfetante para indústria alimentícia**Peracid®**

Fabricante	AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA S/A RUA Tavares de Lyra, 3728 – São José dos Pinhais – PR Fone 41 3888 5200 Fax 41 3888 5218 Email aeb@aeb-brasil.com.br
Emprego	Detergente para indústrias alimentares.
Doses de emprego	De 0,1 a 1,5% diluído em água, com tempo de contato de no mínimo 10 minutos.
Embalagem	Bombonas de 5,0 kg, 15,0 kg e 25,0 kg.

Não corrosivo aos materiais com os quais se pode ter contato durante o emprego como: vidro, alumínio, ferro, aço inox, aço cromado, cerâmica e materiais plásticos.

FICHA TÉCNICA E DE SEGURANÇA

- 2 **COMPOSIÇÃO e INFORMAÇÕES SOBRE INGREDIENTES**
Ácido peracético – CAS 79-21-0. Corrosivo, Comburente - Concentração 9,0 – 11,0%.
Peróxido de hidrogênio – CAS – 7722-81-1. Corrosivo, Comburente - Concentração de 15 a 20%.
- 3 **IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS**
Perigo. Veneno. O produto causa graves queimaduras a pele e aos olhos.
Produto corrosivo.
Produto comburente, favorece a combustão de outras substâncias.
- 4 **MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS**
 Não dê nada via oral a uma pessoa inconsciente.
 Em caso de ingestão acidental não provoque vômito e procure um serviço de saúde ou centro de intoxicação levando esta ficha de segurança, ou a embalagem do produto ou o rótulo do produto.
 Em caso de aspiração ou inalação, remova a pessoa para um local arejado e se houver sinais de intoxicação, chame socorro médico.
 Em caso de contato com a pele ou os olhos, lave com água corrente em abundância e se houver sinais de irritação procure um médico com a presente ficha de segurança ou a embalagem do produto ou o rótulo do produto.
- 5 **MEDIDAS ANTIINCÊNDIO**
 O produto é comburente. Se o preparado estiver envolvido num incêndio, decompõe-se liberando oxigênio que facilita a combustão de outros materiais.
 Afastar o pessoal presente e aproximar-se somente em caso de absoluta necessidade e munido de máscara auto-respiratória.
 Extinguir o incêndio com água, salvo outras indicações. Consultar as fichas dos outros produtos do depósito.
 Manter resfriadas as embalagens através de irroração (pulverização) com água e fazer com que o fogo não seja mais alimentado.
- 6 **MEDIDAS EM CASO DE VAZAMENTO ACIDENTAL**
 Bloquear o derramamento evitar que atinja centros de captação de água.
 Se o produto alcançar centro de captação de água, avisar as autoridades competentes.
- 7 **MANUSEIO E ESTOCAGEM**
 Manusear com óculos de segurança com proteção completa dos olhos. Utilizar luvas de borracha ou PVC.
 Aconselha-se manter o ambiente arejado durante a aplicação
 Manter o produto afastado de fontes de calor e faíscas e de materiais combustíveis.
 O produto tem validade de 12 meses se conservado em condições normais de estocagem em sua embalagem original fechada.
Manter fora do alcance de crianças e dos animais domésticos.
- 8 **VALORES LIMITES DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL**
 Ácido peracético : TLV 1,4 mg/m³/8h (ACGIH)
 Proteção das mãos: manusear com luvas em borracha ou PVC.
 Proteção dos olhos: utilizar óculos de segurança com proteção completa dos olhos.
 Proteção da pele: utilizar avental de borracha ou plástico com botas anti-deslizantes. As calças do macacão devem ser mantidas fora das botas.

9 PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Aspecto físico: Líquido límpido incolor
 Odor: acético
 pH puro: <1,0
 pH a 1%: De 3,0 a 4,0
 Densidade: De 1,06 a 1,12 g/mL
 Solubilidade: Miscível em água em qualquer proporção

10 ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estável as temperaturas normais de estocagem.
 Não misturar com substâncias orgânicas, metais ou substâncias redutoras, uma vez que por decomposição se desenvolve oxigênio e calor com possibilidade de combustões espontâneas. A decomposição do produto em recipiente fechado produz pressão com perigo de explosão. O produto com algumas substâncias (ac. fórmico, acetona, álcoois, permanganato de potássio, etc.) pode reagir de modo explosivo.

11 INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Toxidade aguda por via oral: DL 50 oral 4724 mg/kg ratos wistar machos DL 50 oral 4952 mg/kg ratos wistar fêmeas
 Toxidade aguda cutânea DL 50 cutânea não determinada.

12 INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Ainda estão em fase de pesquisa os critérios para avaliação do impacto com o ambiente.
 O produto não traz nenhuma contribuição ao COD. Isento de fósforo.

13 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESCARTE

O produto a ser descartado deve ser considerado como um refugo especial e como tal deve ser lançado em equipamentos adequados de depuração.
 Não dispondo de equipamentos adequados de depuração dirigir-se a empresas especializadas apresentando a presente ficha. O descarte do refugo, feito por empresas especializadas, deve ser registrado e comunicado às autoridades competentes.
 As embalagens são em polietileno de alta densidade e podem ser recicladas como matérias-primas secundárias, por empresas especializadas e autorizadas.

14 INFORMAÇÕES PARA TRANSPORTE

Número de risco : 539
 Número da ONU : 3109
 Classe de risco : 5.2
 Descrição da classe: Peróxido Orgânico Tipo F,
 Corrosivo e Comburente



Venenoso



Corrosivo



Comburente

15 INFORMAÇÕES SOBRE A REGULAMENTAÇÃO

Produto registrado na ANVISA/MS
 Produto autorizado pelo DIPOA/MA

Natureza dos riscos: Em contato com a pele ou os olhos causa graves queimaduras
 Perigo de explosão ao ser aquecido.

Cuidados preventivos: **Conservar fora do alcance de crianças e de animais domésticos**
 Evitar o contato com os olhos
 Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com água corrente em abundância e consultar um médico.
 Despir imediatamente as vestes contaminadas.
 Usar luvas de borracha ou PVC e proteger os olhos e a face.

16 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

É aconselhável que o responsável pelo uso esteja informado dos riscos específicos que dizem respeito ao uso do produto. O produto não está sujeito a restrições em base a lei que diz respeito aos controles sanitários.
 A presente ficha foi redigida no departamento técnico da AEB spa-Itália, baseados no melhor em sua posse para segurança e consideração a data da última revisão.
 As informações aqui contidas se referem somente as preparações indicadas e podem não valer se o produto for usado em combinação com outras ou em transformações.
 Nada aqui contido deve ser interpretado como garantia, seja explícita ou implícita.
 Em cada caso é responsabilidade do usuário em determinar como essas informações devem ser aplicadas e como determinar a adaptabilidade de cada produto ao seu particular objetivo.



AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA S/A
 Tavares de Lyra, 3728 - Bairro Afonso Pena - São José dos Pinhais - PR
 Fone (041) 3888-5200 Fax (041) 3888-5218- SAC AEB 08007225217 E-mail: aeb@aeb-brasil.com.br

Data da última revisão: 11.07.12